

DELPHION

No active trail

[Select CR](#)[Sign In](#)[RESEARCH](#)[PRODUCTS](#)[INSIDE DELPHION](#)[Log Out](#) [Work Files](#) [Saved Searches](#)[My Account](#)Search: [Quick/Number](#) [Boolean](#) [Advanced](#) [Derwent](#)**The Delphion Integrated View**Get Now: [PDF](#) | [File History](#) | [Other choices](#)Tools: Add to Work File: [Create new Work File](#)View: [Expand Details](#) | [INPADOC](#) | Jump to: [Top](#) [Go to: Derwent](#)[Email this](#)

🔍 Title: **WO0071750A1: METHOD FOR ANALYSING A PATIENT'S GENETIC PREDISPOSITION TO AT LEAST A DISEASE AND AMPLIFICATION ADAPTED TO SUCH A METHOD**[\[French\]](#)

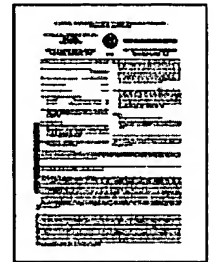
🔍 Derwent Title: Analyzing genetic predisposition to disease, e.g. rheumatoid polyarthritis, by amplification then hybridization to low- and high-resolution oligonucleotide probes [\[Derwent Record\]](#)

🔍 Country: **WO** World Intellectual Property Organization (WIPO)

🔍 Kind: **A1** Publ. of the Int. Appl. with Int. search report ¹

🔍 Inventor: **MOUGIN, Bruno**; 29, rue Lamartine, F-69003 Lyon, France
TIERCY, Jean-Marie; 6, avenue Gasparin, F-12024 Chenes-Bougeries, Switzerland

🔍 Assignee: **BIO MERIEUX**, Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy L'Etoile, France
 📌 *Corporate Tree data:* [Biomerieux SA \(BIOMERIEUX \)](#);
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)



🔍 Published / Filed: **2000-11-30 / 2000-05-19**

🔍 Application Number: **WO2000FR0001385**

🔍 IPC Code: Advanced: **C12Q 1/68**;
 Core: more...
 IPC-7: **C12Q 1/68**;

🔍 ECLA Code: **C12Q1/68M4**;

🔍 Priority Number: 1999-12-06 **FR1999000015314**

🔍 Abstract: The invention concerns a method for analysing a patient's genetic predisposition to at least one disease. It also concerns an amplification process adapted to said method. The method consists in bringing a liquid sample containing at least one type of amplicons, derived from the amplification of at least one polymorphous region of interest related to the searched disease(s), in the presence of probes selected as follows: at least one specific typing probe, said to be low-resolution, capable of being hybridized on the polymorphous region of interest of at least one gene or one group of alleles of said gene borne by the amplicon and associated with at least said disease(s); and at least a specific subtyping probe, said to be high-resolution, capable of being hybridized on said polymorphous region of interest of the allele or group of alleles of the specific typing probe, said to be low-resolution, the high-resolution probe(s) enabling to discriminate the allele(s) associated with the susceptibility and/or the allele(s) associated with resistance to said disease(s), on the basis of their hybridization or non-hybridization. The invention is particularly applicable in the field of diagnosis. [\[French\]](#)

🔍 Attorney, Agent or Firm: **DIDIER, Mireille** ;

🔍 INPADOC Legal Status: [Show legal status actions](#)

Get Now: [Family Legal Status Report](#)

? Designated Country: AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW, **European patent:** AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE, **OAPI patent:** BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG, **ARIPO patent:** GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZW, **Eurasian patent:** AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM

? Family: [Show 17 known family members](#)

? First Claim: [Show all claims](#) REVENDICATIONS

? Description [Expand description](#)

+ PROCEDE D'ANALYSE DE LA PREDISPOSITION GENETIQUE D'UN PATIENT A AU MOINS UNE MALADIE ET AMPLIFICATION ADAPTEE A UN TEL PROCEDE

La présente invention concerne un procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à au moins une maladie, telle que la polyarthrite rhumatoïde ou la spondylarthrite ankylosante.

? Other Abstract Info: None



[Nominate this for the Gallery...](#)



THOMSON

Copyright © 1997-2006 The Thomson

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) |

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
30 novembre 2000 (30.11.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 00/71750 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: **C12Q 1/68**

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01385

(22) Date de dépôt international: 19 mai 2000 (19.05.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/06599 20 mai 1999 (20.05.1999) FR
99/15314 6 décembre 1999 (06.12.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): **BIO
MERIEUX** [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy
L'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): **MOUGIN,
Bruno** [FR/FR]; 29, rue Lamartine, F-69003 Lyon (FR).
TIERCY, Jean-Marie [CH/CH]; 6, avenue Gasparin,
F-12024 Chenes-Bougeries (FR).

(74) Mandataire: **DIDIER, Mireille**; Boîte postale 6153,
F-69466 Lyon Cedex 6 (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR ANALYSING A PATIENT'S GENETIC PREDISPOSITION TO AT LEAST A DISEASE AND AMPLIFICATION ADAPTED TO SUCH A METHOD

(54) Titre: PROCEDE D'ANALYSE DE LA PREDISPOSITION GENETIQUE D'UN PATIENT A AU MOINS UNE MALADIE ET AMPLIFICATION ADAPTEE A UN TEL PROCEDE

(57) Abstract: The invention concerns a method for analysing a patient's genetic predisposition to at least one disease. It also concerns an amplification process adapted to said method. The method consists in bringing a liquid sample containing at least one type of amplicons, derived from the amplification of at least one polymorphous region of interest related to the searched disease(s), in the presence of probes selected as follows: at least one specific typing probe, said to be low-resolution, capable of being hybridized on the polymorphous region of interest of at least one gene or one group of alleles of said gene borne by the amplicon and associated with at least said disease(s); and at least a specific subtyping probe, said to be high-resolution, capable of being hybridized on said polymorphous region of interest of the allele or group of alleles of the specific typing probe, said to be low-resolution, the high-resolution probe(s) enabling to discriminate the allele(s) associated with the susceptibility and/or the allele(s) associated with resistance to said disease(s), on the basis of their hybridization or non-hybridization. The invention is particularly applicable in the field of diagnosis.

(57) Abrégé: La présente invention concerne un procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à au moins une maladie. Elle consiste également en une amplification adaptée à un tel procédé. Le procédé consiste à mettre un échantillon liquide contenant au moins un type d'amplicons, issus de l'amplification d'au moins une région polymorphe d'intérêt en rapport avec la ou les maladies recherchées, en présence de sondes choisies de la façon suivante: au moins une sonde spécifique de typage, dite à faible résolution, capable de s'hybrider sur la région polymorphe d'intérêt d'au moins un gène ou un groupe d'allèles de ce gène porté par l'amplicon et associé à ladite ou auxdites maladies, et au moins une sonde spécifique de sous-typage, dite à haute résolution, capable de s'hybrider sur ladite région polymorphe d'intérêt de l'allèle ou du groupe d'allèles spécifique de la sonde de typage, dite à faible résolution, la ou les sondes à haute résolution permettant de discriminer le ou les allèles associés à la susceptibilité et/ou le ou les allèles associés à la résistance à ladite ou auxdites maladies, selon leur hybridation ou leur non hybridation. L'invention trouve une application préférentielle dans le domaine du diagnostic.



WO 00/71750 A1

**PROCEDE D'ANALYSE DE LA PREDISPOSITION GENETIQUE D'UN
PATIENT A AU MOINS UNE MALADIE ET AMPLIFICATION ADAPTEE A
UN TEL PROCEDE**

5 La présente invention concerne un procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à au moins une maladie, telle que la polyarthrite rhumatoïde ou la spondylarthrite ankylosante.

10 Chaque individu dispose d'un patrimoine génétique propre, hérité de ses ascendants. Ce contexte génétique particulier peut parfois activement participer à l'apparition et/ou au développement de certaines affections : infections par un agent pathogène (virus du SIDA par exemple), maladies autoimmunes (maladies rhumatismales par exemple). Les gènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) notamment les gènes codant pour les antigènes HLA (Human Leukocyte Antigens), jouent un rôle prépondérant dans le développement des pathologies
15 autoimmunes articulaires comme la polyarthrite rhumatoïde (Lawrence, 1970 ; Stastny, 1978 ; Khan, 1979 ; Stastny, 1983 ; Gregersen, 1986 ; Gregersen, 1987 ; Stastny, 1988 ; Todd, 1988 ; Wordsworth, 1989 ; Nepom, 1989 ; Hiraiwa, 1990 ; Nepom, 1991) ou la spondylarthrite ankylosante (Brewerton, 1973 ; Schlosstein, 1973 ; Benjamin, 1990).

20 Une partie importante de la composante génétique de la susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde a pu être associée aux gènes HLA-DRB, codant pour la chaîne β des molécules HLA-DR impliquées dans la présentation des peptides aux lymphocytes T, fonction pivot au cœur des mécanismes de régulation de la réponse immunitaire. Il a été montré plus précisément que la présence d'une séquence
25 particulière de cinq acides aminés, correspondant aux positions 70 à 74 de la troisième région hypervariable des molécules HLA-DR β 1, était retrouvée pour différents allèles rapportés comme étant associés à la polyarthrite rhumatoïde. L'implication de cet « épitope partagé » correspondant aux séquences QKRAA ou QRRAA ou RRRAA (code à une lettre des acides aminés) est désormais bien documentée. Cette explication
30 moléculaire est également cohérente avec l'observation d'une sévérité graduelle de la

maladie lorsque le génotype comprend aucun, un ou deux allèles de susceptibilité, communément appelée effet dose.

La spondylarthrite ankylosante est une autre maladie inflammatoire, pour laquelle une très forte association avec l'antigène HLA-B27 (risque relatif : 69,1) est observée (Baarsma, 1992). En 1977, Schlosstein a publié la forte association entre HLA-B27 et différentes spondylarthropathies (Schlosstein, 1977). Différentes hypothèses sont avancées pour expliquer cette association, impliquant là encore la fonction de présentation de peptides spécifiques, des molécules HLA-B27.

Une association positive a été également publiée entre HLA-B27 et l'uvéite antérieure aiguë (risque relatif : 8,2).

La détection d'antigène(s) HLA-B27 présente un intérêt clinique certain, comme en atteste la pratique courante de cette analyse prescrite en consultation de rhumatologie.

La détection d'allèle(s) HLA-B*27 est également possible en utilisant les techniques de biologie moléculaire d'amplification et d'analyse des régions spécifiques d'intérêt.

Ainsi, en 1985, Weiss a publié l'organisation, la séquence et l'expression du gène HLA-B27. En 1991, Hill a publié une technique d'amplification par PCR des régions polymorphes du gène HLA-B et la détection du HLA-B*2703 par hybridation avec une sonde spécifique (Hill, 1991). En 1992, Dominguez a publié la description de la première méthode de génotypage du B27, après amplification par PCR des régions polymorphes du gène HLA-B.

*Actuellement en ce qui concerne la polyarthrite rhumatoïde, l'identification d'allèle(s) de susceptibilité est généralement faite en routine au cours d'un typage HLA-DR de faible résolution ou générique, permettant notamment la détection d'antigène(s) HLA-DR4 ou d'allèle(s) HLA-DRB1*gr04.*

Ces tests sont effectués par les centres spécialisés dans l'étude des gènes HLA, tels les centres de transfusions sanguines ou certains hôpitaux spécialisés. Cette identification nécessite donc l'envoi d'un échantillon et l'utilisation d'une technologie assez lourde. Les conséquences négatives sont donc nombreuses, telles que :

- les risques de perte de l'échantillon,
- la longue durée de cette identification,

- le coût relativement élevé de ladite identification, et
- l'absence de contrôle par le demandeur sur le prestataire de services.

L'état de la technique est très limité en ce qui concerne les associations HLA-DR et polyarthrite rhumatoïde, qui utilisent une technologie de biologie moléculaire.

5 *Dans le cadre de la spondylarthrite ankylosante, l'état de la technique est constitué essentiellement de techniques d'immunologie. C'est le cas de la demande de brevet WO-A-95/30152 qui permet l'identification de l'antigène B27. Ainsi, concernant la spondylarthrite ankylosante, une simple recherche d'antigène HLA-B27 est habituellement pratiquée en utilisant une technique sérologique (cytométrie de flux ou*
10 *cytotoxicité, avec un anticorps spécifique anti-B27).*

Ces techniques sont rapides mais des réactions faussement négatives sont parfois observées du fait du masquage des antigènes B27 par des autoanticorps ou des peptides (Neumüller, 1993 ; Kirveskari, 1997). De plus, comme toute technique d'analyse d'antigènes exprimés à la surface des lymphocytes, des précautions de bonne
15 conservation des cellules sont nécessaires, parfois contraignantes.

*Toujours dans ce domaine, l'état de la technique est également constitué de techniques de biologie moléculaire. Ainsi, le brevet US-A-4,971,902 concerne des sondes de diagnostic de la prédisposition d'un patient à la polyarthrite rhumatoïde. Ces sondes sont basées sur la reconnaissance du groupe d'allèles DRB1*gr04.*

20 Toutefois, si ce groupe d'allèles DRB1*gr04 est effectivement associé à la polyarthrite rhumatoïde, tous les allèles actuellement connus (DRB1*gr0401 à DRB1*gr0427) ne sont pas forcément associés à cette maladie. Il peut en résulter que si l'on se limite à un typage du groupe d'allèles DRB1*gr04, en fonction des allèles présents, on pourra obtenir, outre de vrais positifs ou de vrais négatifs, des faux positifs
25 qui vont alarmer inutilement le médecin et le patient.

*Qu'il s'agisse d'une technique sérologique (analyse des antigènes DR à l'aide d'une batterie de sérums de spécificité connue : résultats rendus selon la nomenclature DR1 à DR10) ou d'une technique de biologie moléculaire (analyse des allèles DRB1 : résultats rendus selon la nomenclature DRB1*01 à DRB1*10), le clinicien s'intéresse*
30 *essentiellement à la présence d'antigène(s) DR4 ou d'allèle(s) DRB1*gr04, avec l'information « effet dose » éventuellement.*

*En cas de résultats suggérant une prédisposition à la maladie, un deuxième test est généralement pratiqué, utilisant une technique de biologie moléculaire dite de haute résolution dite de sous-typage du DR4, pour préciser l'allèle DRB1*gr04 (DRB1*gr0401 à gr0427 selon la nomenclature officielle en 1998), seuls les allèles*
5 *DRB1*gr0401, gr0404, gr0405 et gr0408 étant rapportés comme étant associés à la maladie.*

Ces tests sont fiables mais longs, plusieurs jours, et coûteux.

Le procédé d'analyse revendiqué permet une analyse simplifiée sur le plan pratique, plus rapide, moins de deux heures, après préparation des amplicons, et peu
10 onéreuse.

A cet effet, la présente invention concerne un procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à au moins une maladie, consistant à mettre un échantillon liquide contenant au moins un type d'amplicons, issus de l'amplification d'au moins une région polymorphe d'intérêt en rapport avec la ou les maladies
15 recherchées, en présence de sondes choisies de la façon suivante :

- au moins une sonde spécifique de typage, dite à faible résolution, capable de s'hybrider sur la région polymorphe d'intérêt d'au moins un gène ou un groupe d'allèles de ce gène porté par l'amplicon et associé à ladite ou auxdites maladies, et
 - au moins une sonde spécifique de sous-typage, dite à haute résolution, capable de
20 s'hybrider sur ladite région polymorphe d'intérêt de l'allèle ou du groupe d'allèles spécifique de la sonde de typage, dite à faible résolution,
- la ou les sondes à haute résolution permettant de discriminer le ou les allèles associés à la susceptibilité et/ou le ou les allèles associés à la résistance à ladite ou auxdites maladies, selon leur hybridation ou leur non hybridation.

25 Afin de détecter la présence d'un autre allèle, lorsqu'un seul allèle du gène ou du groupe d'allèles de ce gène a été détecté, par au moins une sonde spécifique de typage à faible résolution, correspondant au(x) autre(s) groupe(s) d'allèles, le procédé consiste à mettre les amplicons en présence d'au moins une sonde spécifique d'au moins un autre allèle, correspondant au polymorphisme dudit gène ou dudit groupe
30 d'allèles de ce gène détecté par la ou les sondes à faible résolution.

Chaque sonde à faible ou à haute résolution, spécifique de la ou des maladies recherchées, comporte au moins un motif caractéristique de ladite ou desdites maladies recherchées.

Dans le cas où l'on souhaite détecter des allèles HLA-DR de susceptibilité génétique à la Polyarthrite Rhumatoïde et autres maladies associées, on utilise :

- au moins une sonde à faible résolution capable de s'hybrider sur le groupe d'allèles DRB1*gr04,
- au moins une sonde à haute résolution, associée à la susceptibilité génétique à la Polyarthrite Rhumatoïde, capable de s'hybrider avec les allèles suivants : DRB1*0101, DRB1*gr0401, DRB1*gr0404, DRB1*gr0405, DRB1*gr0408 et DRB1*gr1402,
- au moins une sonde à haute résolution, associée à la résistance génétique à la Polyarthrite Rhumatoïde, capable de s'hybrider avec les allèles suivants : DRB1*gr0402, DRB1*gr0403, DRB1*gr0406 et DRB1*gr0407.

De plus, on utilise au moins une sonde à faible résolution capable de s'hybrider sur le groupe d'allèles DRB1*01 et sur l'allèle DRB1*10.

Dans le cas où l'on souhaite détecter la présence d'un autre allèle lorsqu'un seul allèle du groupe d'allèles DRB1*gr04 a été détecté, on utilise au moins une sonde capable de s'hybrider sur les allèles suivants : DRB1*02, DRB1*03, DRB1*07, DRB1*08, DRB1*09, DRB1*11, DRB1*12, DRB1*13 et DRB1*14.

En ce qui concerne les sondes en rapport avec ces allèles, on utilise :

- une sonde SEQID NO 3 pour le typage de DRB1*gr04,
- deux sondes à haute résolution, associées à la susceptibilité génétique à la Polyarthrite Rhumatoïde :
 - SEQ ID NO 4 pour DRB1*gr0401,
 - SEQ ID NO 7 pour DRB1*0101, DRB1*gr0404, DRB1*gr0405, et DRB1*gr0408, DRB1*1402,
- deux sondes à haute résolution, associées à la résistance génétique à la Polyarthrite Rhumatoïde :
 - SEQ ID NO 5 pour DRB1*gr0402, et
 - SEQ ID NO 6 pour DRB1*gr0403, DRB1*gr0406, DRB1*gr0407.

Plus précisément, on utilise également une sonde à haute résolution, SEQ ID NO 8 spécifique de DRB1*gr0405, associée à la susceptibilité génétique à la Polyarthrite Rhumatoïde.

De plus, on utilise les deux sondes suivantes pour le typage :

- 5 - SEQ ID NO 11 pour le groupe d'allèles DRB1*01, et
- SEQ ID NO 15 pour l'allèle DRB1*10.

Dans le cas où l'on souhaite détecter la présence d'un autre allèle lorsqu'un seul allèle du groupe d'allèles DRB1*gr04 a été détecté, l'on utilise quatre sondes de typage suivantes :

- 10 - SEQ ID NO 13 pour DRB1*02,
- SEQ ID NO 14 pour DRB1*07, DRB1*09,
- SEQ ID NO 16 pour DRB1*08, DRB1*12, et
- SEQ ID NO 12 pour DRB1*03, DRB1*11, DRB1*13, DRB1*14.

Quel que soit le cas de figure, chaque sonde à faible ou à haute résolution, spécifique des allèles de susceptibilité génétique à la Polyarthrite Rhumatoïde et autres maladies associées, comporte l'un des motifs caractéristiques suivants : QKRAA, QRRAA ou RRRAA.

Au moins une sonde de contrôle, capable de s'hybrider avec l'ensemble des gènes DRB1, est utilisée pour permettre la détection de tous les gènes DRB1, tel que SEQ ID NO 1 : TTC GAC AGC GAC GTG GGG.

Si l'on veut en plus détecter des allèles de susceptibilité génétique à la Spondylarthrite Ankylosante et autres maladies associées, on utilise au moins une sonde à faible résolution, telle que SEQ ID NO 10, capable de s'hybrider sur le gène HLA-B, spécifique du groupe d'allèles HLA-B27.

Si l'on veut en plus détecter la susceptibilité génétique associée au Lupus Erythémateux Disséminé, à la Connectivite, au Syndrome de Sjögren et autres maladies associées, on utilise au moins une sonde à faible résolution, telle que SEQ ID NO 19, capable de s'hybrider sur le gène HLA-DR, spécifique du groupe d'allèles HLA-DRB1*03.

Quelle que soit la détection recherchée, au plus 38,89 % des bases d'une même sonde à faible résolution ou à haute résolution est remplacée par au moins une base analogue, telle que l'inosine.

Selon une variante de réalisation du procédé, chaque sonde spécifique à faible résolution ou à haute résolution, est placée dans un puits d'une plaque de microtitration indépendamment des autres sondes.

Selon une autre variante de réalisation du procédé, toutes les réactions sont réalisées simultanément.

Préalablement au procédé exposé ci-dessus, au moins une amplification de la ou des régions polymorphes d'intérêt est effectuée.

Une amplification de la ou des régions polymorphes d'intérêt associées au HLA-DR et une amplification de la ou des régions polymorphes d'intérêt associées au HLA-B sont effectuées simultanément.

Selon une variante de réalisation, on effectue une seconde amplification d'au moins une région plus ciblée que celle déjà effectuée sur la région polymorphe, cette région plus ciblée étant une région d'intérêt en rapport avec la ou les maladies recherchées, et on met les amplicons obtenus en présence des sondes précédemment définies.

Selon cette variante, la première amplification est effectuée en même temps que ou préalablement à la seconde amplification plus ciblée.

La présente invention concerne également une amplification d'une séquence correspondant aux groupes d'allèles DRB1*gr04 en vue de son utilisation dans un procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à la polyarthrite rhumatoïde, qui consiste à utiliser des amorces SEQ ID NO 20 en combinaison avec des amorces SEQ ID NO 21.

La présente invention concerne encore une amplification d'une séquence correspondant de l'allèle B27 en vue de son utilisation dans un procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à la spondylarthrite ankylosante, qui consiste à utiliser des amorces SEQ ID NO 22, SEQ ID NO 23 et/ou SEQ ID NO 25 en combinaison avec des amorces SEQ ID NO 24 et/ou SEQ ID NO 26.

De plus, l'invention peut consister à combiner les deux amplifications décrites dans les deux paragraphes ci-dessus, en vue de leur utilisation dans un procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à la polyarthrite rhumatoïde et/ou à la spondylarthrite ankylosante

Dans ce cas, l'amplification, dans laquelle la concentration finale en amorces permettant l'amplification de la séquence correspondant aux groupes d'allèles DRB1*gr04 est supérieure à la concentration finale en amorces permettant l'amplification de la séquence correspondant de l'allèle B27.

5 Dans une variante de réalisation, l'amplification précédente est associée à l'amplification d'une séquence correspondant à une région plus ciblée, incluse dans l'allèle DRB1*gr04, qui consiste à utiliser des amorces SEQ ID NO 21 en combinaison avec des amorces SEQ ID NO 27.

10 Les exemples ci-joint sont donnés à titre d'exemple explicatif et n'ont aucun caractère limitatif. Ils permettront de mieux comprendre l'invention.

La présente invention concerne un procédé de détection de maladies génétiques qui est rapide et d'un faible coût. Cette nouvelle technologie peut être utilisée avec toutes les maladies génétiques et particulièrement avec la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante et d'autres maladies auto-immunes, telles que les
15 connectivites (lupus, sclérodermie, ...) également rencontrées lors de consultation de rhumatologie.

Il s'agit d'un procédé dédié à l'analyse de prédispositions génétiques d'un individu à certaines maladies, par une technique de biologie moléculaire permettant l'analyse simultanée de plusieurs gènes. Ce procédé peut être avantageusement
20 appliqué à l'analyse des prédispositions génétiques d'un individu, pour une maladie ou un ensemble de maladies apparentées, associée(s) à un ou plusieurs gènes. Ce procédé peut être appliqué à l'analyse des prédispositions génétiques d'un individu à certaines maladies auto-immunes inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde et la spondylarthrite ankylosante.

25 L'intérêt de ce procédé est d'obtenir en une étape, avec un test multiple mais unique, un ensemble complet d'informations pertinentes d'intérêt clinique (diagnostique, pronostique et d'orientation thérapeutique). Le procédé se décompose en plusieurs étapes :

- 1) extraction d'acides nucléiques à partir d'un prélèvement biologique de l'individu,
- 30 2) amplification des régions d'intérêt, pour lesquelles un polymorphisme associé à une prédisposition génétique à une pathologie a été décrit, et

3) analyse simultanée des amplicons, utilisant un ensemble de réactions d'hybridation mettant en œuvre un jeu de sondes moléculaires permettant l'analyse précise d'allèles ou de groupes d'allèles donnés.

5 **I - Exemple d'analyse simultanée des prédispositions génétiques d'un individu pour la polyarthrite rhumatoïde et la spondylarthrite ankylosante :**

1°) Extraction d'acides désoxyribonucléiques (ADN) à partir d'un échantillon de sang périphérique :

10 Cette extraction est réalisée de manière tout à fait classique. En fait, on peut utiliser n'importe quelle technique d'extraction d'ADN, permettant d'obtenir du matériel susceptible d'être ultérieurement amplifié par un procédé d'amplification comme la Polymerase Chain Reaction (PCR). Ces techniques de lyse des cellules, avec extraction puis purification des acides nucléiques sont habituellement celles
15 recommandées pour des analyses génétiques, ou techniques rapides utilisant des produits commerciaux, telles que QIAmp Blood Kit (Marque déposée) de QIAGEN S.A.

2°) Amplification simultanée par PCR :

20 Cette amplification concerne les loci suivants

- le locus HLA-DR : incluant la région de l'exon 2 correspondant aux codons 5 à 94 selon la nomenclature officielle, des gènes HLA-DRB
- le locus HLA-B : incluant la région de l'exon 2 correspondant aux codons 25 à 114 selon la nomenclature officielle, du gène HLA-B

25 Le tableau 1 ci-dessous décrit les amorces utilisées lors de l'amplification des deux loci précédemment décrit. Il donne également l'ensemble des conditions physico-chimiques permettant la réalisation de cette amplification.

Amorces	- P1 (amorce 5'-DR) : SEQ ID NO 20 CCG GAT CCT TCG TGT CCC CAC AGC ACG (5'>3') - P2 (amorce 3'-DR) : SEQ ID NO 21 TCG CCG CTG CAC TGT GAA G (5'>3') - P3 (amorce 5'-B) : SEQ ID NO 22 ou SEQ ID NO 23 GGG AGG AGC GAG GGG ACC CCA G (5'>3') ou GGG AGG AGC GAG GGG ACC GCA G (5'>3') - P4 (amorce 3'-B) : SEQ ID NO 24 ATC TCG GAC CCG GAG ACT (5'>3')
Mélange réactionnel	- tampon 10X TEMAG (*) : 10 µl - dNTPs (20 mM) : 1 µl (0,2 mM final) - P1 (30 µM) : 0,8 µl (0,25 µM final) - P2 (30 µM) : 0,8 µl (0,25 µM final) - P3 (30 µM) : 1,3 µl (0,4 µM final) - P4 (30 µM) : 1,3 µl (0,4 µM final) - AmpliTaq (5 U/µl) : 0,5 µl (2.5 U) - ADN : 100-500 ng - H ₂ O : QSP 100 µl
Programme d'amplification	(5 min à 96°C) + 10 x (10 sec à 98°C + 30 sec à 65°C + 30 sec à 72°C) + 30 x (20 sec à 96°C + 30 sec à 65°C + 30 sec à 72°C)

Tableau 1 : Amplification simultanée des régions d'intérêt HLA-DR et HLA-B

5 (*) : Tampon 10X TEMAG : 500 mM Tris-HCl pH 8,8, 150 mM Sulfate Ammonium, 15 mM MgCl₂, 500 µM EDTA, 0,1 % gélatine

3°) Analyse simultanée des amplicons :

10 Cette analyse utilise un ensemble de réactions d'hybridation mettant en œuvre un jeu de sondes oligonucléotidiques permettant l'analyse précise d'allèles ou de

groupes d'allèles HLA-DRB1 et HLA-B*27 importants pour l'étude de prédisposition génétique à la polyarthrite rhumatoïde et à la spondylarthrite ankylosante notamment.

Le tableau 2 décrit l'ensemble des sondes qui est utilisé pour la détection de ces deux maladies. Les indications qui sont données de la gauche vers la droite sont les suivantes :

- la référence de la sonde attribué dans la nomenclature HLA,
- le numéro de la séquence attribué dans ce document,
- le gène HLA concerné,
- la séquence constituant cette sonde, et
- la localisation des codons (trois nucléotides) sur les gènes HLA.

Sonde	SEQ ID NO	Gène HLA	Séquence (5'>3')	Localisation (codons)
C +	1	DR	TTC GAC AGC GAC GTG GGG	40-45
C -	2	-	TAT GAA ACT TAT GGG GAT AC	-
4	3	DR	GAT ACT TCT ATC ACC A	29-34
QK71	4	DR	GAG CAG AAI CGG ICC <i>GAG CAG AAG CGG GCC</i>	69-73
IDE71	5	DR	CTG GAA GAC GAI CGG <i>CTG GAA GAC GAG CGG</i>	68-72
E74	6	DR	AGC AIA IGC IGG ICI AII <i>AGC AGA GGC GGG CCG AGG</i>	69-75
QR71	7	DR	CAG AGG CGI GII ICI GTG <i>CAG AGG CGG GCC GCG GTG</i>	70-75
S57	8	DR	GCC TAG CGC CGA GTA	55-60
C + (B)	9	B	AAA TAC CTC ATG GAG TGG GAG CC	25-32 (*)
B27	10	B	TGC CTT IGC CTT ICA GAT <i>TGC CTT GGC CTT GCA GAT</i>	90-95 (*)
1	11	DR	TGG CAG CTT AAG TTT GAA	9-14
52	12	DR	TAC TCT ACG TCT GAG T	10-15
2	13	DR	CAG CCT AAG AGG GAG TG	10-15
7+9	14	DR	IAG GTI GAC AIC GTG TGC <i>CAG GTG GAC ACC GTG TGC</i>	74-79
10	15	DR	GGA GGA GGT TAA GTT	8-13
8+12	16	DR	CTC TAC GGG IGA GT <i>CTC TAC GGG TGA GT</i>	10-15
3	19	DR	CCG GGT GGA CAA CIA C <i>CCG GGT GGA CAA CTA C</i>	73-78
D1	17	DR	GAA CAG CCA GAA GGA C	61-66
D6	18	B	CTC GCT CTG GTT GTA GTA G	106-113 (*)

Tableau 2 : Sondes oligonucléotidiques

(*) sonde correspondant au brin complémentaire non-codant

Pour certaines sondes, une deuxième séquence en caractères italiques précise la séquence naturelles, c'est-à-dire uniquement constituée des quatre nucléotides adénosine (A), Thymine (T), guanine (G) et cytosine (C). Les autres séquences reprennent les mêmes nucléotides à l'exception de la substitution de certains par des
5 nucléotides différents. Dans le cas présent, il s'agit de l'inosine.

Certaines séquences ne contiennent pas d'inosine, c'est le cas des SEQ ID NO 1, 2, 3, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 17 et 18. D'autres en contiennent peu, c'est le cas de la SEQ ID NO 19, où il y a une inosine sur un total de seize nucléotides, soit 6,25 % de
10 différences par rapport à la séquence de base. D'autres en contiennent beaucoup plus, comme pour la SEQ ID NO 6, où il y a sept inosines sur un total de dix-huit nucléotides, soit environ 38,89 % de différences par rapport à la séquence de base.

L'utilisation des inosines permet d'améliorer encore la spécificité des sondes vis-à-vis des séquences auxquelles elles vont s'hybrider. La spécificité des sondes de
15 captures est bien précisée dans le tableau 3 ci-après.

Sonde	SEQ ID NO	Spécificité
C +	1	Tous les DRB1*
C -	2	Aucun
4	3	DRB1*gr04
QK71	4	DRB1*gr0401 notamment, allèle possédant le motif QKRAA correspondant à l'épitope partagé
IDE71	5	DRB1*gr0402 notamment
E74	6	DRB1*gr0403, gr0406 et gr0407 notamment
QR71	7	DRB1*0101, gr0404, gr0405, gr0408 et 1402 notamment, allèle possédant le motif QRRAA correspondant à l'épitope partagé
S57	8	DRB1*gr0405 notamment
C + (B)	9	Tous les B*
B27	10	B*27 notamment
1	11	DRB1*01
52	12	DRB1*03, 11, 13 et 14 notamment
2	13	DRB1*02
7+9	14	DRB1*07 et 09
10	15	DRB1*10
3	19	DRB1*03 notamment
8+12	16	DRB1*08 et 12 notamment

Tableau 3 : Spécificités principales des sondes de capture

5 Dans ce tableau 3, le terme « notamment » est parfois associé à certains allèles. L'explication réside dans le fait qu'il existe d'autres allèles. Ainsi avec la SEQ ID NO 5, on détecte le DRB1*gr0402 mais également le DRB1*gr0414. Ce dernier est très rare, tellement rare qu'aucune étude n'a été entreprise à ce jour, pour lier sa présence à celle de la polyarthrite rhumatoïde. Néanmoins, les motifs de ces deux allèles étant

semblables au niveau des régions polymorphes d'intérêt, il y a de forte chance que leur susceptibilité soit identique vis-à-vis de cette maladie.

Les sondes D1 et D6, correspondant aux SEQ ID NO 17 et 18 sont des sondes de détection.

5 Elles reconnaissent les régions observées chez tous les allèles d'un même gène. Ainsi, la sonde SEQ ID NO 17 est choisie dans une région conservée du gène HLA DR, alors que la sonde SEQ ID NO 18 est choisie dans une région conservée du gène HLA B.

10 Cette analyse des sondes peut être effectuée sur des plaques de micro-titration ou micro-plaques dont le format est normalisé. Ces plaques comportent des barrettes isolées de huit puits, qui peuvent être assemblées selon le nombre de tests à réaliser. Pour des impératifs de commodité et de coût, l'utilisation de deux barrettes par tests et avantageuse.

15 L'objectif est d'obtenir des résultats avec un minimum de barrettes, car le coût de fabrication doit être le plus réduit possible tout en ayant des prestations de très haut niveau. Ce minimum correspond à deux barrettes.

20 Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde et de la spondylarthrite ankylosante, on peut donc utiliser deux barrettes, qui seront respectivement appelées R1 et R2. Si pour la barrette R1, une possibilité est proposer, deux cas de figure sont possibles en ce qui concerne R2.

Barrette R1		Barrette R2		Barrette R2bis	
C +	SEQ ID NO 1	C + (B)	SEQ ID NO 9	C + (B)	SEQ ID NO 9
C -	SEQ ID NO 2	B27	SEQ ID NO 10	B27	SEQ ID NO 10
4	SEQ ID NO 3	1	SEQ ID NO 11	1	SEQ ID NO 11
QK71	SEQ ID NO 4	52	SEQ ID NO 12	52	SEQ ID NO 12
IDE71	SEQ ID NO 5	2	SEQ ID NO 13	2	SEQ ID NO 13
E74	SEQ ID NO 6	7+9	SEQ ID NO 14	3	SEQ ID NO 19
QR71	SEQ ID NO 7	10	SEQ ID NO 15	10	SEQ ID NO 7
S57	SEQ ID NO 8	8+12	SEQ ID NO 16	7+9+8+12	SEQ ID NO 14 et 16

Tableau 4 : Organisation du multi-test (répartition des sondes dans les puits)

5 La barrette R1 comporte un contrôle positif (SEQ ID NO 1), qui permet de détecter tous les allèles du gène DRB1*, ce qui permet de contrôler que l'amplification a bien concerné la région d'intérêt comprise entre les amorces P1 et P2 décrites dans le tableau 1. Le contrôle négatif (SEQ ID NO 2) n'a pas d'objectif diagnostic, il n'est présent que pour répondre à certaines normes. Cette séquence n'est absolument pas
10 spécifique du HLA, et correspond à une séquence aléatoire non retrouvée chez les gènes HLA.

La SEQ ID NO 3 permet le typage de l'ensemble des allèles qui constitue le groupe DRB1*gr04. Elle permet l'identification de tous les allèles DRB1*gr04, allèles appartenant au groupe défini par des techniques de typage HLA par sérologie, comme
15 le groupe DR4. Il s'agit d'une sonde à faible résolution, c'est-à-dire que de nombreux allèles peuvent être reconnus par celle-ci.

Les SEQ ID NO 4 à 8 permettent, quant à elles, le sous-typage de certains des allèles qui constituent le groupe DRB1*gr04, en précisant le ou les allèles partageant une séquence particulière. Il s'agit de sondes à haute résolution, c'est-à-dire que
20 quelques allèles, voire un seul, peuvent être reconnus par une de ces sondes.

Toutes ces sondes sont utilisées pour détecter les allèles possédant l'épitope partagé associés à la prédisposition génétique à la polyarthrite rhumatoïde. Plus particulièrement, les sondes SEQ ID NO 4 et 7 permettent de détecter les allèles associés à la susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde, , et les sondes SEQ ID NO 5 et 6 permettent de détecter les allèles associés à la résistance à ladite polyarthrite rhumatoïde. La sonde SEQ ID NO 8 permet de confirmer la présence d'un allèle DRB1*gr0405.

La barrette R2 comporte un contrôle positif (SEQ ID NO 9), qui permet de détecter les amplicons correspondant à l'exon 2 du gène HLA-B, ce qui permet de contrôler que l'amplification a bien concerné la région d'intérêt comprise entre les amorces P3 et P4 décrites dans le tableau 1.

Elle comporte d'autre part une SEQ ID 10, qui permet de détecter le groupe des allèles B*27, utilisée pour déterminer si un individu est prédisposé à développer une spondylarthrite ankylosante.

Pour le reste, cette barrette est constituée de sondes de faible résolution, à savoir les SEQ ID NO 11 à 16, qui permettent de compléter l'analyse des deux haplotypes de tout individu, notamment en indiquant si la présence d'allèles de susceptibilité ou de résistance à la polyarthrite rhumatoïde, révélée par la barrette R1, concerne l'un ou les deux haplotypes (effet dose).

Selon la balance entre allèle de susceptibilité, allèle de résistance et allèle neutre, les risques de développer une polyarthrite rhumatoïde plus ou moins sévère sont différents et les moyens thérapeutiques à mettre en œuvre seront adaptés à ce diagnostic.

Dans le cas de la barrette 2bis, on reprend sensiblement la même configuration que la barrette R2, à l'exception de deux modifications.

Premièrement, deux réactions ont été regroupées. Ainsi, un seul puits contient en son sein deux sondes différentes, à savoir SEQ ID NO 14 et SEQ ID NO 16.

Le puits ainsi libéré permet l'ajout d'une nouvelle sonde SEQ ID NO 19 qui est associée à la présence d'allèles DRB1*03 (DR3). Il est en effet judicieux de pouvoir identifier de façon indépendante ce groupe d'allèles DRB1*03, retrouvé associé à d'autre maladies, comme le Lupus Erythémateux Disséminé, la Connectivite, le Syndrome de Sjögren, le diabète insulino-dépendant par exemple.

4°) Préparation des réactifs permettant l'analyse des amplicons préparés :

Le principe d'hybridation inverse utilisé, est celui décrit dans le document WO-A-93/02213 de la demanderesse, dont le contenu est considéré comme contenu dans notre demande de brevet. Brièvement, les sondes spécifiques de capture sont adsorbées de façon passive sur le polystyrène des puits de barrettes montées en micro-plaques, grâce à une modification de leur extrémité 5' (présence d'une fonction -NH₂). Les sondes de détection sont des oligonucléotides couplés de façon covalente à l'enzyme HRP (Horse Radish Peroxydase) grâce à une modification de leur extrémité 5' (présence d'une fonction -NH₂). La composition du tampon d'hybridation a été modifiée comme suit :

- 75 mM Na₂HPO₄, 2H₂O,
- 25 mM NaH₂PO₄, H₂O,
- pH 6,8,
- 500 mM NaCl,
- 2 % PEG 4000,
- 0,65 % de Tween 20,
- 0,1 % de gélatine,
- 0,14 g/l d'ADN soniqué,
- 0,001 % de Ciprofloxacine chlorhydrate, et
- 0,02 % de Bromo-Nitro-Dioxane.

Un multi-test est constitué par une barrette R1 et une barrette R2 ou R2bis, comme décrit dans le tableau 4.

5°) Mode opératoire :

- 1) Dénaturation des amplicons : aux 100 µl de solution d'amplicons préparés, sont ajoutés 10 µl de réactif de dénaturation (2N NaOH). Incubation 5 minutes à 18-25°C.
- 2) Ajout de 2 ml de tampon d'hybridation, de 0,2 ml de solution contenant les sondes de détection.
- 3) Répartition du mélange, à raison de 100 µl dans chacun des seize puits sensibilisés correspondant à un multi-test. Couvrir d'une feuille autocollante.

- 4) Incubation 60 minutes à l'étuve à 37°C (35-39°C).
- 5) Elimination du matériel non hybridé par lavage à 18-25°C.
- 6) Révélation de la réaction enzymatique, en répartissant 100 µl par puits de solution de substrat (OPD, orthophénylène diamine). Incuber 20 minutes à 18-25°C, à l'obscurité.
- 7) Lecture des résultats : directe ou enregistrement des densités optiques (lecture à 492 nm).
- 8) Interprétation des résultats.

II - Exemples et résultats :

Les résultats obtenus avec différents échantillons au typage HLA connu sont présentés ci-après :

1°) Premier échantillon :

Les deux tableaux 5 et 6 suivants représentent les résultats obtenus avec deux barrettes R1 et R2.

Barrette R1	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 1	> 2500	+
SEQ ID NO 2	-	-
SEQ ID NO 3	898	+
SEQ ID NO 4	256	+
SEQ ID NO 5	1	-
SEQ ID NO 6	0	-
SEQ ID NO 7	10	-
SEQ ID NO 8	9	-

Barrette R2	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 9	>2500	+
SEQ ID NO 10	0	-
SEQ ID NO 11	0	-
SEQ ID NO 12	0	-
SEQ ID NO 13	2044	+
SEQ ID NO 14	0	-
SEQ ID NO 15	1	-
SEQ ID NO 16	3	-

Tableau 5 : Barrette R1

Tableau 6 : Barrette R2

Du fait de l'utilisation d'une barrette R2, deux analyses sont possibles.

Premièrement, l'analyse du HLA-DR montre que :

- la sonde SEQ ID NO 1 est positive : l'amplification HLA-DR et le test d'hybridation ont correctement fonctionné,
- 5 - les sondes SEQ ID NO 3 et SEQ ID NO 4 sont positives : un allèle DRB1*gr0401 est présent, et
- la sonde SEQ ID NO 13 est positive : un allèle DRB1*02 est présent.

En conclusion, il y a présence d'un seul allèle de susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde (DRB1*gr0401), le second allèle étant DRB1*02 qui fait preuve de neutralité vis-à-vis de la polyarthrite rhumatoïde.

Deuxièmement, l'analyse du HLA-B montre que :

- la sonde SEQ ID NO 9 est positive : l'amplification HLA-B et le test d'hybridation ont correctement fonctionné, et
- la sonde SEQ ID NO 10 négative : il y a absence d'allèle B*27.

15 Le patient dont l'échantillon a été testé n'est pas susceptible à la spondylarthrite ankylosante.

Le typage HLA de ce premier échantillon était :

- HLA-DRB1*gr0401 / 1602, et
- HLA-B*5701.

2°) Deuxième échantillon :

20 Les deux tableaux 7 et 8 suivants représentent les résultats obtenus avec deux barrettes R1 et R2.

Barrette R1	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 1	> 2500	+
SEQ ID NO 2	0	-
SEQ ID NO 3	261	+
SEQ ID NO 4	0	-
SEQ ID NO 5	312	+
SEQ ID NO 6	0	-
SEQ ID NO 7	4	-
SEQ ID NO 8	0	-

Tableau 7 : Barrette R1

Barrette R2	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 9	>2500	+
SEQ ID NO 10	0	-
SEQ ID NO 11	0	-
SEQ ID NO 12	0	-
SEQ ID NO 13	2300	-
SEQ ID NO 14	0	-
SEQ ID NO 15	0	-
SEQ ID NO 16	0	-

Tableau 8 : Barrette R2

5 Il y a quatre sondes positives, qui sont :

- la sonde SEQ ID NO 1 : l'amplification HLA-DR et le test d'hybridation ont bien fonctionné,

- la sonde SEQ ID NO 3 : il y a présence d'au moins un allèle DRB1*gr04,

- la sonde SEQ ID NO 5 : il y a présence d'au moins un allèle DRB1*gr0402, et

10 - la sonde SEQ ID NO 9 : il y a présence d'au moins un allèle B* mais pas de B*27 puisque la SEQ ID NO 10 est négative.

Il s'agit donc présence d'un allèle DR4, mais d'un sous-type non impliqué dans la susceptibilité génétique à la PR (DRB1*gr0402). L'identification du deuxième allèle permet d'établir qu'il s'agit de DRB1*02.

15

Le typage HLA de ce troisième échantillon était :

- HLA-DRB1*gr0402 / 02, et

- HLA-B différent de B*27.

20 3°) Troisième échantillon :

Les deux tableaux 9 et 10 suivants représentent les résultats obtenus avec deux barrettes R1 et R2.

Barrette R1	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 1	>2500	+
SEQ ID NO 2	-	-
SEQ ID NO 3	4	-
SEQ ID NO 4	21	-
SEQ ID NO 5	1145	+
SEQ ID NO 6	0	-
SEQ ID NO 7	8	-
SEQ ID NO 8	0	-

Tableau 9 : Barrette R1

Barrette R2bis	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 9	>2500	+
SEQ ID NO 10	2228	+
SEQ ID NO 11	12	-
SEQ ID NO 12	1278	+
SEQ ID NO 13	877	+
SEQ ID NO 14	0	-
SEQ ID NO 15	0	-
SEQ ID NO 16	5	-

Tableau 10 : Barrette R2

5 Comme les deux exemples précédents, deux analyses sont possibles.

Premièrement, l'analyse du HLA-DR montre que :

- la sonde SEQ ID NO 1 est positive : l'amplification HLA-DR et le test d'hybridation ont correctement fonctionné,
- la sonde SEQ ID NO 3 est négative : il y a absence d'allèle DRB1*gr04,
- 10 - les sondes SEQ ID NO 5 et SEQ ID NO 12 sont positives : un allèle DRB1*11 ou 13 est présent, et
- la sonde SEQ ID NO 13 est positive : il y a présence d'un allèle DRB1*02.

En conclusion, il n'y a aucun allèle de susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde, les deux allèles DR ont cependant été identifiés au niveau générique.

15 Deuxièmement, l'analyse du HLA-B montre que :

- la sonde SEQ ID NO 9 est positive : l'amplification HLA-B et le test d'hybridation ont correctement fonctionné, et
- la sonde SEQ ID NO 10 est positive : il y a présence d'au moins un allèle B*27.

Le typage HLA de ce troisième échantillon était :

- 20 - HLA-DRB1*02 / 1301, et
- HLA-B*27.

4°) Quatrième échantillon :

Les deux tableaux 11 et 12 suivants représentent les résultats obtenus avec deux barrettes R1 et R2bis.

La configuration avec deux barrettes R1 et surtout R2bis (Voir tableau 4) permet, en plus de l'analyse de la susceptibilité génétique à la polyarthrite rhumatoïde et à la spondylarthrite ankylosante, de mieux analyser la susceptibilité génétique au Lupus Erythémateux Disséminé, aux Connectivites, au Syndrome de Sjögren et autres maladies rencontrées lors d'une consultation de rhumatologie. Ceci est réalisé en combinant dans un seul puits les SEQ ID NO 14 et 16, qui renferment les sondes 7, 8, 9 et 12, dont les spécificités sont décrites dans le tableau 3.

Barrette R1	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 1	> 2500	+
SEQ ID NO 2	0	-
SEQ ID NO 3	275	+
SEQ ID NO 4	241	+
SEQ ID NO 5	0	-
SEQ ID NO 6	0	-
SEQ ID NO 7	0	-
SEQ ID NO 8	0	-

Tableau 11 : Barrette R1

Barrette R2	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 9	>2500	+
SEQ ID NO 10	0	-
SEQ ID NO 11	0	-
SEQ ID NO 12	1832	+
SEQ ID NO 13	2	-
SEQ ID NO 19	849	+
SEQ ID NO 15	0	-
SEQ ID NO 14	67	-
+ 16		

Tableau 12 : Barrette R2

Il y a six sondes positives, qui sont :

- la sonde SEQ ID NO 1 : l'amplification HLA-DR et le test d'hybridation ont bien fonctionné,
- la sonde SEQ ID NO 3 : il y a présence d'au moins un allèle DRB1*gr04,
- la sonde SEQ ID NO 4 : il y a présence d'au moins un allèle DRB1*gr0401,
- la sonde SEQ ID NO 9 : il y a présence d'au moins un allèle B* mais pas de B*27 puisque la SEQ ID NO 10 est négative,

- la sonde SEQ ID NO 12 : il y a présence d'au moins un allèle DRB1*03, 11, 13 ou 14, et
- la sonde SEQ ID NO 19 : il y a présence d'au moins un allèle DRB1*03.

5 Il y a donc présence d'un allèle de susceptibilité génétique à la polyarthrite rhumatoïde du fait de l'existence de l'allèle DRB1*gr0401, et d'un allèle de susceptibilité génétique au Lupus Erythémateux Disséminé du fait de l'existence de l'allèle DRB1*03 chez ce patient. Il n'y a pas d'allèle concernant le B*27.

Le typage HLA de ce quatrième échantillon était :

- HLA-DRB1*gr0401 / 0301, et
- 10 - HLA-B différent de B*27.

III - Optimisations des résultats :

15 L'objectif a été d'améliorer les conditions dans lesquelles doit être réalisée l'amplification. Les conditions optimales sont récapitulées dans le tableau 13 ci-dessous.

Amorces	<ul style="list-style-type: none"> - P1 (amorce 5'-DR) : SEQ ID NO 20 CCG GAT CCT TCG TGT CCC CAC AGC ACG (5'>3') - P2 (amorce 3'-DR) : SEQ ID NO 21 TCG CCG CTG CAC TGT GAA G (5'>3') - P3 (amorce 5'-B) : SEQ ID NO 25 GGG AGG AGC GAG GGG ACC GCA (5'>3') - P4 (amorce 3'-B) : SEQ ID NO 26 ATC TCG GAC CCG GAG ACT CG (5'>3')
Mélange réactionnel	<ul style="list-style-type: none"> - tampon 10X TEMAG (*) : 10 µl - dNTPs (20 mM) : 1 µl (0,2 mM final) - P1 (40 µM) : 1 µl (0,4 µM final) - P2 (40 µM) : 1 µl (0,4 µM final) - P3 (30 µM) : 1 µl (0,3 µM final) - P4 (30 µM) : 1 µl (0,3 µM final) - AmpliTaq (5 U/µl) : 0,5 µl (2,5 U) - ADN : 100-500 ng - H₂O : QSP 100 µl
Programme d'amplification	(5 min à 96°C) + 10 x (10 sec à 98°C + 30 sec à 65°C + 30 sec à 72°C) + 30 x (20 sec à 96°C + 30 sec à 62°C + 30 sec à 72°C)

Tableau 13 : Amplification simultanée et optimisée des régions
d'intérêt HLA-DR et HLA-B

5

Les différences entre les conditions d'amplification du tableau 1 et du tableau 9 résident donc dans le choix des amorces P3 et P4 légèrement modifiées, de nouvelles concentrations en amorces P1, P2, P3 et P4 et une variation de température dans le programme d'amplification. L'apport dans les résultats de ces modifications est précisé dans les tableaux 14, 15 et 16 qui correspondent chacun à un échantillon différent de patients.

10

	Conditions initiales	Amorces optimisées	Amplification optimisée	Amorces et amplification optimisées
SEQ ID NO 1	> 2500	> 2500	> 2500	> 2500
SEQ ID NO 2	0	0	0	0
SEQ ID NO 3	97	171	202	365
SEQ ID NO 4	52	95	59	42
SEQ ID NO 5	959	1552	966	1472
SEQ ID NO 6	0	0	0	0
SEQ ID NO 7	17	44	31	45
SEQ ID NO 8	0	16	0	3
SEQ ID NO 9	1237	1708	1627	1792
SEQ ID NO 10	211	363	394	414
SEQ ID NO 11	3	0	0	0
SEQ ID NO 12	882	895	737	791
SEQ ID NO 13	0	0	0	0
SEQ ID NO 14	0	0	0	0
SEQ ID NO 15	0	0	0	0
SEQ ID NO 16	0	0	0	0

Tableau 14 : Etude comparative du premier échantillon

Le typage de ce premier échantillon est de DRB1*gr0404 / 52.

	Conditions initiales	Amorces optimisées	Amplification optimisée	Amorces et amplification optimisées
SEQ ID NO 1	789	1335	1240	1914
SEQ ID NO 2	0	0	0	0
SEQ ID NO 3	353	649	635	944
SEQ ID NO 4	14	49	45	102
SEQ ID NO 5	104	232	228	463
SEQ ID NO 6	0	0	0	0
SEQ ID NO 7	0	0	0	0
SEQ ID NO 8	0	0	0	0
SEQ ID NO 9	1822	> 2500	2120	2240
SEQ ID NO 10	0	0	0	0
SEQ ID NO 11	0	0	0	0
SEQ ID NO 12	0	0	0	0
SEQ ID NO 13	1	5	2	1
SEQ ID NO 14	0	0	0	0
SEQ ID NO 15	0	0	0	0
SEQ ID NO 16	0	0	3	0

Tableau 15 : Etude comparative du deuxième échantillon

5

Le typage de ce deuxième échantillon est de DRB1*gr0401 / gr0402.

	Conditions initiales	Amorces optimisées	Amplification optimisée	Amorces et amplification optimisées
SEQ ID NO 1	615	1156	1052	2098
SEQ ID NO 2	0	0	0	0
SEQ ID NO 3	429	691	679	1381
SEQ ID NO 4	0	0	0	0
SEQ ID NO 5	0	0	0	0
SEQ ID NO 6	8	23	17	66
SEQ ID NO 7	14	26	21	66
SEQ ID NO 8	64	174	131	405
SEQ ID NO 9	1348	2377	2089	2191
SEQ ID NO 10	296	622	567	490
SEQ ID NO 11	0	0	0	0
SEQ ID NO 12	0	0	0	0
SEQ ID NO 13	3	0	1	0
SEQ ID NO 14	0	0	0	0
SEQ ID NO 15	0	0	0	0
SEQ ID NO 16	0	2	0	0

Tableau 16 : Etude comparative du troisième échantillon

5 Le typage de ce troisième échantillon est de DRB1*gr0403 / gr0405.

Toutes ces valeurs sont des valeurs de DO multipliées par mille (DO x 1000). La valeur maximale lisible étant de 2,5, lorsque le chiffre est supérieur à cette valeur, on indique uniquement que la valeur est supérieure à 2500 (>2500).

10 On remarque que toutes les valeurs significatives les plus élevées ont été mises en exergue par épaississement du trait. Il s'agit uniquement des sondes positives. Pour le premier échantillon, sur les sept valeurs significatives, toutes sont issues des conditions optimisées par rapport aux conditions initiales. Trois sont associées à

l'optimisation des amorces et quatre à l'optimisation des amorces et de l'amplification. Pour le deuxième échantillon, sur les cinq valeurs significatives, toutes sont issues des conditions optimisées par rapport aux conditions initiales. Une est associée à l'optimisation des amorces et quatre à l'optimisation des amorces et de l'amplification.

5 Pour le troisième échantillon, sur les sept valeurs significatives, toutes sont issues des conditions optimisées par rapport aux conditions initiales. Deux sont associées à l'optimisation des amorces et cinq à l'optimisation des amorces et de l'amplification.

L'optimisation de l'amplification seule se justifie moins que l'optimisation des amorces seule ou l'optimisation des amorces et de l'amplification. Néanmoins on
10 remarque que sur les séquences correspondant aux dix-neuf valeurs significatives, dix-huit sont en faveur de l'optimisation de l'amplification par rapport aux conditions initiales.

En comparant les techniques d'amplification selon le tableau 1 et selon le tableau 13, on s'aperçoit que l'amplification est plus efficace lorsque la concentration
15 finale en amorces permettant l'amplification de la séquence correspondant aux groupes d'allèles DRB1*gr04 est supérieure à la concentration finale en amorces permettant l'amplification de la séquence correspondant à l'allèle B27.

IV - Perfectionnements :

20

Dans certains cas des ambiguïtés peuvent apparaître. Ainsi les amorces n'étant pas spécifiques du DR4, d'autres allèles sont amplifiés ce qui peut entraîner des difficultés d'interprétation. C'est par exemple le cas dans les trois exemples ci-dessous, la seule solution est alors d'effectuer une amplification plus ciblée sur le DR4, à l'aide
25 d'amorces particulières telles que décrites dans le tableau 17 ci-dessous :

Amorces	- P5 (amorce 5'-DR) : SEQ ID NO 27 GTT TCT TGG AGC AGG TTA AAC (5'>3') - P2 (amorce 3'-DR) : SEQ ID NO 21 TCG CCG CTG CAC TGT GAA G (5'>3')
Mélange réactionnel	- tampon Tris-HCl pH 8,3 : 50 µM - dNTPs (20 mM) : 1 µl (0,2 mM final) - P2 (30 µM) : 1 µl (0,3 µM final) - P5 (30 µM) : 1 µl (0,3 µM final) - AmpliTaq (5 U/µl) : 0,3 µl (1,5 U) - ADN : 100-500 ng - H ₂ O : QSP 100 µl
Programme d'amplification	(2 min à 95°C) + 32 x (30 sec à 95°C + 30 sec à 55°C + 30 sec à 72°C) + 30 x (20 sec à 96°C + 30 sec à 62°C + 30 sec à 72°C) + 7 min à 72°C

Tableau 17 : Amplification ciblée d'une région d'intérêt HLA-DR

- 5 Les exemples qui montrent de telles ambiguïtés et leur résolution sont les suivants.

1°) Premier échantillon :

Barrette R1	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 1	>2500	+
SEQ ID NO 2	< 50	-
SEQ ID NO 3	197	+
SEQ ID NO 4	182	+
SEQ ID NO 5	1692	+
SEQ ID NO 6	0	-
SEQ ID NO 7	11	-
SEQ ID NO 8	3	-

Tableau 18 : Barrette R1

Barrette R2bis	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 9	>2500	+
SEQ ID NO 10	0	-
SEQ ID NO 11	2	-
SEQ ID NO 12	1519	+
SEQ ID NO 13	0	-
SEQ ID NO 14	0	-
SEQ ID NO 15	0	-
SEQ ID NO 16	0	-

Tableau 19 : Barrette R2

5

Dans ce cas, il n'est pas possible, sans prendre de risque de différencier dans le groupe DRB1*gr04 (SEQ ID NO 3 est positive) entre DRB1*gr0401 (SEQ ID NO 4 est positive) et DRB1*gr0402 (SEQ ID NO 5 est positive). L'autre allèle est un gr52 (SEQ ID NO 12 est positive). De plus, les chiffres bruts tendent à privilégier DRB1*gr0402 puisque la SEQ ID NO 5 a une valeur positive de 1692, alors que pour DRB1*gr0401 la SEQ ID NO 4 n'est positive qu'avec une valeur de 182.

10

Pourtant la seconde analyse va permettre de différencier ces deux allèles. C'est ce qui est bien représenté sur les tableaux 20 et 21.

Barrette R1	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 1	2181	+
SEQ ID NO 2	< 50	-
SEQ ID NO 3	1281	+
SEQ ID NO 4	200	+
SEQ ID NO 5	0	-
SEQ ID NO 6	0	-
SEQ ID NO 7	1	-
SEQ ID NO 8	0	-

Tableau 20 : Barrette R1

Barrette R2bis	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 9	ND	?
SEQ ID NO 10	ND	?
SEQ ID NO 11	0	-
SEQ ID NO 12	0	-
SEQ ID NO 13	0	-
SEQ ID NO 14	0	-
SEQ ID NO 15	0	-
SEQ ID NO 16	0	-

Tableau 21 : Barrette R2

On voit donc bien sur cette seconde analyse qu'il s'agit de DRB1*gr0401 (SEQ ID NO 4 est positive), alors que DRB1*gr0402 (SEQ ID NO 5 est négative). La différenciation entre DRB1*gr0401 et DRB1*gr0402 est donc possible, ce qui a une grande incidence puisque ces deux allèles n'ont pas le même impact sur la polyarthrite rhumatoïde. Ainsi, DRB1*gr0401 est associé à la susceptibilité génétique à la polyarthrite rhumatoïde, et DRB1*gr0402 est associé à la résistance génétique à la polyarthrite rhumatoïde.

Le typage de ce premier échantillon est donc DRB1*gr0401 / gr52.

2°) Deuxième échantillon :

Barrette R1	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 1	>2500	+
SEQ ID NO 2	< 50	-
SEQ ID NO 3	193	+
SEQ ID NO 4	21	-
SEQ ID NO 5	0	-
SEQ ID NO 6	0	-
SEQ ID NO 7	72	+
SEQ ID NO 8	137	+

Tableau 22 : Barrette R1

Barrette R2bis	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 9	>2500	+
SEQ ID NO 10	1	-
SEQ ID NO 11	1	-
SEQ ID NO 12	1827	+
SEQ ID NO 13	0	-
SEQ ID NO 14	0	-
SEQ ID NO 15	0	-
SEQ ID NO 16	3	-

Tableau 23 : Barrette R2

5

Dans ce cas, il n'est pas possible, sans prendre de risque de différencier dans le groupe DRB1*gr04 (SEQ ID NO 3 est positive) entre DRB1*gr0404 (SEQ ID NO 7 est positive) et DRB1*gr0405 (SEQ ID NO 7 et SEQ ID NO 8 sont toutes les deux positives). L'autre allèle est un gr52 (SEQ ID NO 12 est positive).

10

Pourtant la seconde analyse va permettre de différencier ces deux allèles. C'est ce qui est bien représenté sur les tableaux 24 et 25.

Barrette R1	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 1	>2500	+
SEQ ID NO 2	< 50	-
SEQ ID NO 3	>2500	+
SEQ ID NO 4	0	-
SEQ ID NO 5	0	-
SEQ ID NO 6	0	-
SEQ ID NO 7	773	+
SEQ ID NO 8	560	+

Tableau 24 : Barrette R1

Barrette R2bis	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 9	ND	?
SEQ ID NO 10	ND	?
SEQ ID NO 11	0	-
SEQ ID NO 12	0	-
SEQ ID NO 13	0	-
SEQ ID NO 14	0	-
SEQ ID NO 15	0	-
SEQ ID NO 16	0	-

Tableau 25 : Barrette R2

On voit donc bien sur cette seconde analyse qu'il s'agit de DRB1*gr0405 (SEQ ID NO 7 et SEQ ID NO 8 sont positives), alors que s'il s'agissait de DRB1*gr0404 la SEQ ID NO 8 aurait dû être négative. La différenciation entre DRB1*gr0404 et DRB1*gr0405 est donc possible, ce qui a moins d'incidence que dans l'exemple précédent puisque, selon nos connaissances actuelles, ces deux allèles ont le même impact sur la polyarthrite rhumatoïde. Ainsi, DRB1*gr0404 et DRB1*gr0405 sont tous les deux associés à la susceptibilité génétique à la polyarthrite rhumatoïde. Bien entendu, l'importance de cette seconde analyse pourra varier si nos connaissances futures prouvent un impact plus important d'un de ces deux allèles par rapport à l'autre.

Le typage de ce deuxième échantillon est donc DRB1*gr0405 / gr52.

3°) Troisième échantillon :

Barrette R1	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 1	>2500	+
SEQ ID NO 2	< 50	-
SEQ ID NO 3	237	+
SEQ ID NO 4	1	-
SEQ ID NO 5	0	-
SEQ ID NO 6	0	-
SEQ ID NO 7	156	+
SEQ ID NO 8	563	+

Barrette R2bis	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 9	>2500	+
SEQ ID NO 10	637	+
SEQ ID NO 11	2	-
SEQ ID NO 12	4	-
SEQ ID NO 13	0	-
SEQ ID NO 14	0	-
SEQ ID NO 15	0	-
SEQ ID NO 16	248	+

5

Tableau 26 : Barrette R1Tableau 27 : Barrette R2

10

Dans ce cas, il n'est pas possible, sans prendre de risque de différencier dans le groupe DRB1*gr04 (SEQ ID NO 3 est positive) entre DRB1*gr0404 (SEQ ID NO 7 est positive) et DRB1*gr0405 (SEQ ID NO 7 et SEQ ID NO 8 sont toutes les deux positives). L'autre allèle est un gr8+12 (SEQ ID NO 16 est positive), qui est neutre pour la polyarthrite rhumatoïde ou la spondylarthrite ankylosante, selon nos connaissances actuelles. Il faut noter également que, contrairement aux deux exemples précédents, un allèle B*27 est présent. La seconde analyse va encore une fois permettre de différencier ces deux allèles. C'est ce qui est bien représenté sur les tableaux 28 et

15

29.

Barrette R1	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 1	>2500	+
SEQ ID NO 2	< 50	-
SEQ ID NO 3	1453	+
SEQ ID NO 4	0	-
SEQ ID NO 5	0	-
SEQ ID NO 6	0	-
SEQ ID NO 7	467	+
SEQ ID NO 8	1	-

Tableau 28 : Barrette R1

Barrette R2bis	DO x 1000	+ / -
SEQ ID NO 9	ND	?
SEQ ID NO 10	ND	?
SEQ ID NO 11	0	-
SEQ ID NO 12	0	-
SEQ ID NO 13	0	-
SEQ ID NO 14	0	-
SEQ ID NO 15	0	-
SEQ ID NO 16	0	-

Tableau 29 : Barrette R2

5 On voit donc bien sur cette seconde analyse qu'il s'agit de DRB1*gr0404
 puisque SEQ ID NO 7 est positive et SEQ ID NO 8 est négative, alors que s'il
 s'agissait de DRB1*gr0405 la SEQ ID NO 8 aurait dû être positive, comme dans
 l'exemple précédent. La différenciation entre DRB1*gr0404 et DRB1*gr0405 est donc
 possible, ce qui a moins d'incidence que dans le premier exemple puisque ces deux
 10 allèles ont le même impact sur la polyarthrite rhumatoïde. Ainsi, DRB1*gr0404 et
 DRB1*gr0405 sont tous les deux associés à la susceptibilité génétique à la polyarthrite
 rhumatoïde. Néanmoins, on peut réitérer les remarques faites pour le deuxième
 échantillon.

Le typage de ce troisième échantillon est donc DRB1*gr0404 / gr8+12, avec
 15 présence d'au moins un allèle B*27.

V - Conclusions :

20 Comme le prouve ces exemples, le procédé revendiqué permet de pratiquer
 simultanément, en une ou deux étapes, la recherche de susceptibilité génétique à la
 polyarthrite rhumatoïde, basée sur une analyse totalement dédiée aux informations
 attendues par le clinicien (DR1, DR4, DR10, sous-types du DRB1*gr04, présence du

motif QKRAA, QRRAA et RRRAA, effet dose), et également la recherche du HLA-B*27 souvent informative lors d'une consultation en rhumatologie.

5 La pertinence de l'information HLA-DR et HLA-B27 est demandée lors d'une consultation en rhumatologie. Simplicité, praticabilité et rapidité du test, avec en corollaire un impact financier important, sont les avantages du procédé selon l'invention.

**Références bibliographiques incorporées à la présente description, en tant que de
besoin**

5 Baarsma, 1992 :

Baarsma GS, Current Eye Researc, 1992, 11 suppl., 1-9

Benjamin, 1990 :

10 Benjamin R, Parham P, Immunology Today, 1990, 11, 137-142, Guilt by association :
HLA-B27 and ankylosing spondylitis

Brewerton, 1973 :

Brewerton DA, Caffrey M, Hart FD et al, Lancet, 1973, 1, 904-907. Ankylosing
spondylitis and HL-A27.

15

Dominguez, 1992 :

Dominguez O, Coto E, Martinez-Naves E, Choo SY, Lopez-Larrea C,
Immunogenetics, 1992, 36, 277-282. Molecular typing of HLA-B27 alleles (RM H #
311)

20

Gregersen, 1986 :

Gregersen PK, Shen M, Song QL, Merryman P, Degar S, Seki T, Maccari J, Goldberg
D, Murphy H, Schwenzer J, Wang CY, Winchester RJ, Nepom GT, Silver J, Proc.
Natl. Acad . Sci. USA, 1986, 83, 2642-2646. Molecular diversity of HLA-DR4
25 haplotypes.

Gregersen, 1987 :

Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ, Arthritis Rheum., 1987, 30, 1205-1213. The
shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of
30 susceptibility to rheumatoid arthritis.

Hill, 1991 :

Hill AVS et al, The Lancet, 1991, March 16, 337, 640-642)

Hiraiwa, 1990 :

5 Hiraiwa A, Yamanaka K, Kwok WW, Mickelson EM, Masewicz S, Hansen JA, Radka SF, Nepom GT, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 8051-8055. Structural requirements for recognition of the HLA-Dw14 class II epitope : a key HLA determinant associated with rheumatoid arthritis.

Khan, 1979 :

10 Khan MA, Kushner I, Ballou SP et al, Lancet, 1979, 1, 921-922, Familial rheumatoid arthritis and HLA-DRW4.

Kirveskari, 1997 :

15 Kirveskari J, Kellner H, Wuorela M, Soini H, Frankengerger B, Leirisalo-Repo M, Weiss EH, Granfors K, Br. J. Rheumatol., 1997, 36, 185-189, False-negative serological HLA-B27 typing results may be due to altered antigenic epitopes and can be detected by polymerase chain reaction.

Lawrence, 1970 :

20 Lawrence J, Ann. Rheum. Dis., 1970, 29, 357-379

Nepom, 1989 :

Nepom GT, Byers P, Seyfried C, Healey LA, Wilske KR, Stage D, Nepom BS, Arthritis Rheum. 1989, 32, 15-21. HLA genes associated with rheumatoid arthritis.
25 Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes.

Nepom, 1991 :

Nepom GT, Erlich H, Annu. Rev. Immunol., 1991, 9, 493-525. MHC class-II molecules and autoimmunity.

30

Neumüller, 1993 :

Neumüller J, Fischer M, Eberl R, Rheumatol. Int., 1993, 13, 163-167. Failure of the serological determination of HLA-B27 due to antigen masking in patients with ankylosing spondylitis

5 Schlosstein, 1973 :

Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM, N. Engl. J. Med., 1973, 288, 704-706. High association of a HL-A antigen, w27, with ankylosing spondylitis

10 Stastny, 1978 :

Stastny P, N. Engl. J. Med., 1978, 298, 869-871. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis.

15 Stastny, 1983 :

Stastny P, Ball EJ, Dry PJ, Nunez G, Immunol. Rev., 1983, 70, 113-154. The human immune response region (HLA-D) and disease susceptibility.

20 Stastny, 1988 :

Stastny P, Ball E, Kahn M, Olsen N, Pincus T, Gao X, Br. J. Rheumatol., 1988, 27, 132-138. HLA-DR4 and other genetic markers in rheumatoid arthritis.

25 Todd, 1988 :

Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, Chao N, Fronek Z, Jacob CO, McDermott M, Sinha AA, Timmerman L, McDevitt HO, Science, 1988, 240, 1003-1009

30 Weiss, 1985 :

Weiss EH, Kuon W, Doerner C, Lang M, Riethmüller G, Immunobiology, 1985, 170, 367-380, A molecular approach to analyze HLA and disease associations

35 Wordsworth, 1989 :

Wordsworth BP, Lanchbury JS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 10049-10053

REVENDEICATIONS

1. Procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à au moins une maladie, consistant à mettre un échantillon liquide contenant au moins un type d'amplicons, issus de l'amplification d'au moins une région polymorphe d'intérêt en rapport avec la ou les maladies recherchées, en présence de sondes choisies de la façon suivante :

- au moins une sonde spécifique de typage, dite à faible résolution, capable de s'hybrider sur la région polymorphe d'intérêt d'au moins un gène ou un groupe d'allèles de ce gène porté par l'amplicon et associé à ladite ou auxdites maladies, et
- au moins une sonde spécifique de sous-typage, dite à haute résolution, capable de s'hybrider sur ladite région polymorphe d'intérêt de l'allèle ou du groupe d'allèles spécifique de la sonde de typage, dite à faible résolution,

la ou les sondes à haute résolution permettant de discriminer le ou les allèles associés à la susceptibilité et/ou le ou les allèles associés à la résistance à ladite ou auxdites maladies, selon leur hybridation ou leur non hybridation.

2. Procédé, selon la revendication 1, afin de détecter la présence d'un autre allèle, lorsqu'un seul allèle du gène ou du groupe d'allèles de ce gène a été détecté, par au moins une sonde spécifique de typage à faible résolution, correspondant au(x) autre(s) groupe(s) d'allèles, consistant à mettre les amplicons en présence d'au moins une sonde spécifique d'au moins un autre allèle, correspondant au polymorphisme dudit gène ou dudit groupe d'allèles de ce gène détecté par la ou les sondes à faible résolution.

3. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que chaque sonde à faible ou à haute résolution, spécifique de la ou des maladies recherchées, comporte au moins un motif caractéristique de ladite ou desdites maladies recherchées.

4. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, pour la détection d'allèles HLA-DR de susceptibilité génétique à la Polyarthrite Rhumatoïde et autres maladies associées, caractérisé en ce que l'on utilise :

- au moins une sonde à faible résolution capable de s'hybrider sur le groupe d'allèles DRB1*gr04,
- au moins une sonde à haute résolution, associée à la susceptibilité génétique à la Polyarthrite Rhumatoïde, capable de s'hybrider avec les allèles suivants : DRB1*0101, DRB1*gr0401, DRB1*gr0404, DRB1*gr0405, DRB1*gr0408 et DRB1*1402,
- au moins une sonde à haute résolution, associée à la résistance génétique à la Polyarthrite Rhumatoïde, capable de s'hybrider avec les allèles suivants : DRB1*gr0402, DRB1*gr0403, DRB1*gr0406 et DRB1*gr0407.

5. Procédé, selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'on utilise au moins une sonde à faible résolution capable de s'hybrider sur le groupe d'allèles DRB1*01 et sur l'allèle DRB1*10.

6. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 4 ou 5, afin de détecter la présence d'un autre allèle lorsqu'un seul allèle du groupe d'allèles DRB1*gr04 a été détecté, caractérisé en ce que l'on utilise au moins une sonde capable de s'hybrider sur les allèles suivants : DRB1*02, DRB1*03, DRB1*07, DRB1*08, DRB1*09, DRB1*11, DRB1*12, DRB1*13 et DRB1*14.

7. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisé en ce que l'on utilise :

- une sonde SEQ ID NO 3 pour le typage de DRB1*gr04,
- deux sondes à haute résolution, associées à la susceptibilité génétique à la Polyarthrite Rhumatoïde :
 - SEQ ID NO 4 pour DRB1*gr0401,
 - SEQ ID NO 7 pour DRB1*0101, DRB1*gr0404, DRB1*gr0405, et DRB1*04gr08, DRB1*1402,
- deux sondes à haute résolution, associées à la résistance génétique à la Polyarthrite Rhumatoïde :

- SEQ ID NO 5 pour DRB1*gr0402, et
- SEQ ID NO 6 pour DRB1*gr0403, DRB1*gr0406, DRB1*gr0407.

5 8. Procédé, selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'on utilise également une sonde à haute résolution, SEQ ID NO 8 spécifique de DRB1*gr0405, associée à la susceptibilité génétique à la Polyarthrite Rhumatoïde.

9. Procédé, selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'on utilise les deux sondes suivantes pour le typage :

10 - SEQ ID NO 11 pour le groupe d'allèles DRB1*01, et

- SEQ ID NO 15 pour l'allèle DRB1*10.

10. Procédé, selon la revendication 6, afin de détecter la présence d'un autre allèle lorsqu'un seul allèle du groupe d'allèles DRB1*gr04 a été détecté, caractérisé en

15 ce que l'on utilise quatre sondes de typage suivantes :

- SEQ ID NO 13 pour DRB1*02,
- SEQ ID NO 14 pour DRB1*07, DRB1*09,
- SEQ ID NO 16 pour DRB1*08, DRB1*12, et
- SEQ ID NO 12 pour DRB1*03, DRB1*11, DRB1*13, DRB1*14.

20 11. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 4 à 10, caractérisé en ce que chaque sonde à faible ou à haute résolution, spécifique des allèles de susceptibilité génétique à la Polyarthrite Rhumatoïde et autres maladies associées, comporte l'un des motifs caractéristiques suivants : QKRAA, QRRAA ou RRRAA.

25 12. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 4 à 11, caractérisé en ce qu'au moins une sonde de contrôle, capable de s'hybrider avec l'ensemble des gènes DRB1, est utilisée pour permettre la détection de tous les gènes DRB1, tel que SEQ ID NO 1 : TTC GAC AGC GAC GTG GGG.

30 13. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 4 à 12, pour la détection d'allèles de susceptibilité génétique à la Spondylarthrite Ankylosante et autres maladies

associées, caractérisé en ce que l'on utilise au moins une sonde à faible résolution, telle que SEQ ID NO 10, capable de s'hybrider sur le gène HLA-B, spécifique de groupe d'allèles HLA-B27.

5 14. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 4 à 13, pour la détection de la susceptibilité génétique associée au Lupus Erythémateux Disséminé, aux Connectivites, au Syndrome de Sjögren et autres maladies associées, caractérisé en ce que l'on utilise au moins une sonde à faible résolution, telle que SEQ ID NO 19, capable de s'hybrider sur le gène HLA-DR, spécifique du groupe d'allèles DRB1*03.

10 15. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'au plus 38,89 % des bases d'une même sonde à faible résolution ou à haute résolution est remplacée par au moins une base analogue, telle que l'inosine.

15 16. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que chaque sonde spécifique à faible résolution ou à haute résolution, est placée dans un puits d'un plaque de microtitration indépendamment des autres sondes.

20 17. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que toutes les réactions sont réalisées simultanément.

 18. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que, préalablement, au moins une amplification de la ou des régions polymorphes d'intérêt est effectuée.

25 19. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que, préalablement, une amplification de la ou des régions polymorphes d'intérêt associées au HLA-DR et une amplification de la ou des régions polymorphes d'intérêt associées au HLA-B sont effectuées simultanément.

30 20. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, caractérisé en ce qu'on effectue une seconde amplification d'au moins une région plus ciblée que celle déjà effectuée sur la région polymorphe, cette région plus ciblée étant une région

d'intérêt en rapport avec la ou les maladies recherchées, et qu'on met les amplicons obtenus en présence des sondes précédemment définies.

5 21. Procédé, selon la revendication 20, caractérisé en ce que la première amplification est effectuée en même temps que ou préalablement à la seconde amplification plus ciblée.

10 22. Amplification d'une séquence correspondant aux groupes d'allèles DRB1*gr04 en vue de son utilisation dans un procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à la polyarthrite rhumatoïde, qui consiste à utiliser des amorces SEQ ID NO 20 en combinaison avec des amorces SEQ ID NO 21.

15 23. Amplification d'une séquence correspondant de l'allèle B27 en vue de son utilisation dans un procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à la spondylarthrite ankylosante, qui consiste à utiliser des amorces SEQ ID NO 22, SEQ ID NO 23 et/ou SEQ ID NO 25 en combinaison avec des amorces SEQ ID NO 24 et/ou SEQ ID NO 26.

20 24. Amplifications, consistant à combiner les deux amplifications selon les revendications 22 et 23, en vue de son utilisation dans un procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à la polyarthrite rhumatoïde et/ou à la spondylarthrite ankylosante

25 25. Amplification, selon la revendication 24, dans laquelle la concentration finale en amorces permettant l'amplification de la séquence correspondant aux groupes d'allèles DRB1*gr04 est supérieure à la concentration finale en amorces permettant l'amplification de la séquence correspondant de l'allèle B27.

30 26. Amplification, selon l'une quelconque des revendications 22 à 25, d'une séquence correspondant à une région plus ciblée, incluse dans l'allèle DRB1*gr04, qui consiste à utiliser des amorces SEQ ID NO 21 en combinaison avec des amorces SEQ ID NO 27.

LISTE DE SEQUENCES

	<110> bioMérieux	
5	<120> Procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à au moins une maladie et amplification adaptée à un tel procédé	
10	<130> HLASICK2	
	<140>	
	<141>	
	<160> 27	
15	<170> PatentIn Ver. 2.1	
	<210> 1	
	<211> 18	
20	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 1	18
25	ttcgacagcg acgtgggg	
	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Homo sapiens	
	<400> 2	20
	tatgaaactt atggggatac	
35	<210> 3	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 3	16
	gatacttcta tcacca	
45	<210> 4	
	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
50	<400> 4	15
	gagcagaanc ggncc	
	<210> 5	
55	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 5 ctggaagacg ancgg	15
5	<210> 6 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapiens	
10	<400> 6 agcanangcn ggncnann	18
15	<210> 7 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 7 cagaggcgng nnncngtg	18
25	<210> 8 <211> 15 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30	<400> 8 gcctagcgcc gagta	15
35	<210> 9 <211> 23 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 9 aaatacctca tggagtggga gcc	23
45	<210> 10 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapiens	
50	<400> 10 tgccttngcc ttncagat	18
55	<210> 11 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapiens	
55	<400> 11 tggcagctta agtttgaa	18

<210> 12
<211> 16
<212> ADN
<213> Homo sapiens
5
<400> 12
tactctacgt ctgagt 16

10 <210> 13
<211> 17
<212> ADN
<213> Homo sapiens

15 <400> 13
cagcctaaga gggagtg 17

20 <210> 14
<211> 18
<212> ADN
<213> Homo sapiens

25 <400> 14
naggtngaca ncgtgtgc 18

30 <210> 15
<211> 15
<212> ADN
<213> Homo sapiens

35 <400> 15
ggaggagggtt aagtt 15

40 <210> 16
<211> 14
<212> ADN
<213> Homo sapiens

45 <400> 16
ctctacgggn gagt 14

50 <210> 17
<211> 16
<212> ADN
<213> Homo sapiens

55 <400> 17
gaacagccag aaggac 16

55 <210> 18
<211> 19
<212> ADN
<213> Homo sapiens

	<400> 18 ctcgctctgg ttgtagtag	19
5	<210> 19 <211> 16 <212> ADN <213> Homo sapiens	
10	<400> 19 ccgggtggac aacnac	16
15	<210> 20 <211> 27 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 20 ccggatcctt cgtgtcccca cagcacg	27
25	<210> 21 <211> 19 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30	<400> 21 tcgccgctgc actgtgaag	19
35	<210> 22 <211> 22 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 22 gggaggagcg aggggacccc ag	22
45	<210> 23 <211> 22 <212> ADN <213> Homo sapiens	
50	<400> 23 gggaggagcg aggggaccgc ag	22
55	<210> 24 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 24 atctcggacc cggagact	18

	<210> 25	
	<211> 11	
	<212> ADN	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 25	
	aggggaccgc a	11
10	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 26	
	atctcggacc cggagactcg	20
20	<210> 27	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 27	
	gtttcttgga gcagggttaaa c	21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01385

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

STRAND, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GARCIA-PACHECO J M ET AL: "Routine HLA DRB/DQB oligonucleotide typing by a non-radioactive dot-blot micromethod" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, vol. 180, no. 1, 13 March 1995 (1995-03-13), pages 35-43, XP004021068 ISSN: 0022-1759 the whole document	1-10, 16-19
X	FR 2 679 252 A (BIO MERIEUX) 22 January 1993 (1993-01-22) the whole document	1-6, 9, 10, 16-18 22
Y		
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 October 2000

Date of mailing of the international search report

17/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Knehr, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01385

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BEIN G ET AL.: "Rapid HLA-DRB1 genotyping by nested PCR amplification" TISSUE ANTIGENS, vol. 39, 1992, pages 68-73, XP000949259 the whole document	1-6, 17-21
X	WO 98 35059 A (CHRETIEN PIERRE ;ELLEXSON MARY (US); DUTHIE R SCOTT (US); HILDEBRA) 13 August 1998 (1998-08-13) the whole document	1-4,13, 17-21,23
X	KIM H-Y ET AL.: "Predominance of HLA-DRB1*0405 in Korean patients with rheumatoid arthritis" ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, vol. 54, 1995, pages 988-990, XP000878854 * see especially table 1, and page 989, column 2, paragraph 2 * the whole document	1-4,11, 12,17-19
X	KAWAI S ET AL.: "A simple method of HLA-DRB typing using enzymatically amplified DNA and immobilized probes on microtiter plates" HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 41, 1994, pages 121-126, XP000890112 * see especially SSO's DRB1002N, DRB7004, and DRB1008W within table 1 * the whole document	1-3,5,6, 9,14, 16-19
X	EVANS T I ET AL.: "The genotypic distribution of shared-epitope DRB1 alleles suggests a recessive mode of inheritance of the rheumatoid arthritis disease-susceptibility gene" ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 38, no. 12, 1995, pages 1754-1761, XP000878857 the whole document	1-4,6, 14,17,18
X	US 5 468 611 A (BAXTER-LOWE LEE A ET AL) 21 November 1995 (1995-11-21) * see especially table 3 * the whole document	1-4,6-8, 10,11, 18,19
X	WO 97 46700 A (BIO MERIEUX ;MOUGIN BRUNO (FR)) 11 December 1997 (1997-12-11) * see especially SEQ ID NO:32 * the whole document	1-3,12, 17,18
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01385

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI , 1997 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 059711 XP002133035 "Detection and typing of class I MHC HLA-DR antigens - can check multiple specimens easily and type all HLA-DR (D-related) antigens known to be present in the Japanese population" -& JP 08 308596 A (WAKUNAGA SEIYAKU KK), 26 November 1997 (1997-11-26) * see especially abstract (sequence No.3) and page 3 (sequence 11a) * abstract</p>	1-3,5,6, 9,10,14, 17-19
X	<p>ALLEN M ET AL.: "Allele-specific HLA-DRB1 amplification of forensic evidence samples with mixed genotypes" BIOTECHNIQUES, vol. 19, no. 3, 1995, pages 454-463, XP002133033 * see especially primer UG115 within table 1 * the whole document</p>	1-5,9, 20,21
X	<p>US 5 567 809 A (GRIFFITH ROBERT L ET AL) 22 October 1996 (1996-10-22) * see especially table 9 * * see especially SEQ ID Nos: 173, 187, 227, 90, 98 and 89 * the whole document</p>	1-6,9, 10,18 7,8,22
X	<p>DATABASE WPI , 1994 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 146988 XP002133036 "Oligo:nucleotide probes for HLA-DR typing of human DNA - and reagent kits containing probes, new amplification primers and buffers" -& JP 06 090757 A (KITASATO KENHYUSHO SH), 5 April 1994 (1994-04-05) * see especially column 17, 31, 45 (sequence 13), 43(sequence 4), 46(sequence 14), 59 (sequence 64), and column 44(sequence 9) * abstract</p>	1-4,7,8, 14,18,19
Y		15

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.
PCT/FR 00/01385

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PETERSDORF E W ET AL.: "POLYMORPHISM OF HLA-DRW52-ASSOCIATED DRB1 GENES AS DEFINED BY SEQUENCE-SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE PROBE HYBRIDIZATION AND SEQUENCING" TISSUE ANTIGENS, DK, MUNKSGAARD, COPENHAGEN, vol. 38, no. 4, 1 October 1991 (1991-10-01), pages 169-177, XP000673021 ISSN: 0001-2815 the whole document	1-4, 6-8, 11, 14, 15, 17-19
Y	HAWORTH S ET AL.: "Polymyalgia rheumatica is associated with both HLA-DRB1*0401 and DRB1*0404" BRITISH JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, vol. 35, 1996, pages 632-635, XP000878853 the whole document	1-4, 6, 11, 14, 18
Y	TAKEUCHI F ET AL.: "Positive and negative association of HLA-DR genotypes with Japanese rheumatoid arthritis" CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY, vol. 14, 1996, pages 17-22, XP000878869 the whole document	1-4, 6, 11, 17, 18
Y	NEPOM G T ET AL.: "HLA genes associated with rheumatoid arthritis" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, vol. 32, no. 1, 1989, pages 15-21, XP000879219 cited in the application the whole document	1-4, 6-8, 11
Y	WAGNER U ET AL.: "HLA markers and prediction of clinical course and outcome in rheumatoid arthritis" ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 40, no. 2, 1997, pages 341-351, XP000878856 the whole document	1-4, 11, 18, 19
Y	GAO X ET AL.: "DNA typing for class II HLA antigens with allele-specific or group-specific amplification" HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 30, 1991, pages 147-154, XP000889911 the whole document	1, 4, 7, 8
A	WO 97 20070 A (ANTHONY NOLAN BONE MARROW TRUS ; ARGUELLO RAFAEL (GB); MADRIGAL ALE) 5 June 1997 (1997-06-05) * see especially page 35, line 14 * the whole document	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/01385

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CEREB N ET AL: "LOCUS-SPECIFIC AMPLIFICATION OF HLA CLASS I GENES FROM GENOMIC DNA: LOCUS-SPECIFIC SEQUENCES IN THE FIRST AND THIRD INTRONS OF HLA-A, -B, AND -C ALLELES" TISSUE ANTIGENS,DK,MUNKSGAARD, COPENHAGEN, vol. 45, 1995, pages 1-11, XP000197333 ISSN: 0001-2815 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>WO 92 08117 A (APPLIED BIOSYSTEMS) 14 May 1992 (1992-05-14) the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>ANGELINI G ET AL.: "High-resolution analysis of the human HLA-DR polymorphism by hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA, vol. 83, 1986, pages 4489-4493, XP002133034 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>WO 99 19509 A (LEUSHNER JAMES ;GAREY CAROLINE ELIZABETH (CA); VISIBLE GENETICS INC) 22 April 1999 (1999-04-22) the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>EP 0 887 423 A (BIOTEST AG) 30 December 1998 (1998-12-30) the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>WORDSWORTH B P ET AL: "HLA-DR TYPING USING DNA AMPLIFICATION BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION AND SEQUENTIAL HYBRIDIZATION TO SEQUENCE-SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE PROBES" IMMUNOGENETICS,DE,SPRINGER VERLAG, BERLIN, vol. 32, 1 January 1990 (1990-01-01), pages 413-418, XP002911048 ISSN: 0093-7711 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>WO 99 07883 A (LEUSHNER JAMES ;VISIBLE GENETICS INC (CA); BLASCZYK RAINER H (DE)) 18 February 1999 (1999-02-18) * see especially clam 14 (Sequence NO:436) * the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01385

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2679252	A	22-01-1993	AT 174064 T	15-12-1998
			AU 659866 B	01-06-1995
			AU 2388592 A	23-02-1993
			CA 2091775 A	18-01-1993
			DE 69227756 D	14-01-1999
			DE 69227756 T	29-07-1999
			EP 0549776 A	07-07-1993
			ES 2126597 T	01-04-1999
			WO 9302213 A	04-02-1993
			JP 6501622 T	24-02-1994
			US 5976789 A	02-11-1999
WO 9835059	A	13-08-1998	AU 6321998 A	26-08-1998
			EP 0986650 A	22-03-2000
US 5468611	A	21-11-1995	US 5545526 A	13-08-1996
			US 5702885 A	30-12-1997
WO 9746700	A	11-12-1997	FR 2749308 A	05-12-1997
			EP 0910667 A	28-04-1999
JP 8308596	A	26-11-1996	US 5939542 A	17-08-1999
US 5567809	A	22-10-1996	AT 164630 T	15-04-1998
			AU 656161 B	27-01-1995
			AU 9136191 A	08-07-1992
			CA 2075037 A	07-06-1992
			DE 69129192 D	07-05-1998
			DE 69129192 T	22-10-1998
			DK 514534 T	11-01-1999
			EP 0514534 A	25-11-1992
			ES 2115667 T	01-07-1998
			JP 6505625 T	30-06-1994
			WO 9210589 A	25-06-1992
			AT 73502 T	15-03-1992
			AT 125307 T	15-08-1995
			AU 594130 B	01-03-1990
			AU 6996287 A	17-09-1987
			CA 1284931 A	18-06-1991
			DE 3751423 D	24-08-1995
			DE 3777213 D	16-04-1992
			EP 0237362 A	16-09-1987
			EP 0459532 A	04-12-1991
			EP 0459533 A	04-12-1991
			HK 145894 A	30-12-1994
			JP 2703194 B	26-01-1998
			JP 7313197 A	05-12-1995
			JP 2726659 B	11-03-1998
			JP 62214355 A	21-09-1987
			JP 3070837 B	31-07-2000
			JP 10155500 A	16-06-1998
			SG 132994 G	13-01-1995
			US 5541065 A	30-07-1996
			US 5310893 A	10-05-1994
			US 5665548 A	09-09-1997
			US 5468613 A	21-11-1995
			US 6040166 A	21-03-2000
			US 5604099 A	18-02-1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01385

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
JP 6090757	A	05-04-1994	NONE		
WO 9720070	A	05-06-1997	AU	7703896 A	19-06-1997
			EP	0876508 A	11-11-1998
WO 9208117	A	14-05-1992	NL	9002259 A	18-05-1992
			AT	186945 T	15-12-1999
			DE	69131801 D	30-12-1999
			DE	69131801 T	18-05-2000
			EP	0553247 A	04-08-1993
			US	5759771 A	02-06-1998
WO 9919509	A	22-04-1999	US	5910413 A	08-06-1999
			AU	9425798 A	03-05-1999
			EP	1021559 A	26-07-2000
EP 0887423	A	30-12-1998	EP	0892069 A	20-01-1999
WO 9907883	A	18-02-1999	AU	8846898 A	01-03-1999
			EP	1003917 A	31-05-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Derri Internationale No
PCT/FR 00/01385

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C1201/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

STRAND, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	GARCIA-PACHECO J M ET AL: "Routine HLA DRB/DQB oligonucleotide typing by a non-radioactive dot-blot micromethod" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, vol. 180, no. 1, 13 mars 1995 (1995-03-13), pages 35-43, XP004021068 ISSN: 0022-1759 le document en entier ---	1-10, 16-19
X	FR 2 679 252 A (BIO MERIEUX) 22 janvier 1993 (1993-01-22) le document en entier ---	1-6, 9, 10, 16-18 22
Y	le document en entier ---	
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

17/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Knehr, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Don : Internationale No
PCT/FR 00/01385

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BEIN G ET AL.: "Rapid HLA-DRB1 genotyping by nested PCR amplification" TISSUE ANTIGENS, vol. 39, 1992, pages 68-73, XP000949259 le document en entier ---	1-6, 17-21
X	WO 98 35059 A (CHRETIEN PIERRE ; ELLEXSON MARY (US); DUTHIE R SCOTT (US); HILDEBRA) 13 août 1998 (1998-08-13) le document en entier ---	1-4, 13, 17-21, 23
X	KIM H-Y ET AL.: "Predominance of HLA-DRB1*0405 in Korean patients with rheumatoid arthritis" ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, vol. 54, 1995, pages 988-990, XP000878854 * see especially table 1, and page 989, column 2, paragraph 2 * le document en entier ---	1-4, 11, 12, 17-19
X	KAWAI S ET AL.: "A simple method of HLA-DRB typing using enzymatically amplified DNA and immobilized probes on microtiter plates" HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 41, 1994, pages 121-126, XP000890112 * see especially SSO's DRB1002N, DRB7004, and DRB1008W within table 1 * le document en entier ---	1-3, 5, 6, 9, 14, 16-19
X	EVANS T I ET AL.: "The genotypic distribution of shared-epitope DRB1 alleles suggests a recessive mode of inheritance of the rheumatoid arthritis disease-susceptibility gene" ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 38, no. 12, 1995, pages 1754-1761, XP000878857 le document en entier ---	1-4, 6, 14, 17, 18
X	US 5 468 611 A (BAXTER-LOWE LEE A ET AL) 21 novembre 1995 (1995-11-21) * see especially table 3 * le document en entier ---	1-4, 6-8, 10, 11, 18, 19
X	WO 97 46700 A (BIO MERIEUX ; MOUGIN BRUNO (FR)) 11 décembre 1997 (1997-12-11) * see especially SEQ ID NO:32 * le document en entier ---	1-3, 12, 17, 18
	-/-	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der » Internationale No
PCT/FR 00/01385

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE WPI , 1997 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 059711 XP002133035 "Detection and typing of class I MHC HLA-DR antigens - can check multiple specimens easily and type all HLA-DR (D-related) antigens known to be present in the Japanese population" -& JP 08 308596 A (WAKUNAGA SEIYAKU KK), 26 novembre 1997 (1997-11-26) * see especially abstract (sequence No.3) and page 3 (sequence 11a) * abrégé</p>	1-3,5,6, 9,10,14, 17-19
X	<p>ALLEN M ET AL.: "Allele-specific HLA-DRB1 amplification of forensic evidence samples with mixed genotypes" BIOTECHNIQUES, vol. 19, no. 3, 1995, pages 454-463, XP002133033 * see especially primer UG115 within table 1 * le document en entier</p>	1-5,9, 20,21
X	<p>US 5 567 809 A (GRIFFITH ROBERT L ET AL) 22 octobre 1996 (1996-10-22)</p>	1-6,9, 10,18
Y	<p>* see especially table 9 * * see especially SEQ ID Nos: 173, 187, 227, 90, 98 and 89 * le document en entier</p>	7,8,22
X	<p>DATABASE WPI , 1994 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 146988 XP002133036 "Oligo:nucleotide probes for HLA-DR typing of human DNA - and reagent kits containing probes, new amplification primers and buffers" -& JP 06 090757 A (KITASATO KENHYUSHO SH), 5 avril 1994 (1994-04-05)</p>	1-4,7,8, 14,18,19
Y	<p>* see especially column 17, 31, 45 (sequence 13), 43(sequence 4), 46(sequence 14), 59 (sequence 64), and column 44(sequence 9) * abrégé</p>	15
-/--		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der . le Internationale No
PCT/FR 00/01385

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>PETERSDORF E W ET AL.: "POLYMORPHISM OF HLA-DRW52-ASSOCIATED DRB1 GENES AS DEFINED BY SEQUENCE-SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE PROBE HYBRIDIZATION AND SEQUENCING" TISSUE ANTIGENS, DK, MUNKSGAARD, COPENHAGEN, vol. 38, no. 4, 1 octobre 1991 (1991-10-01), pages 169-177, XP000673021 ISSN: 0001-2815 le document en entier</p>	1-4, 6-8, 11, 14, 15, 17-19
Y	<p>HAWORTH S ET AL.: "Polymyalgia rheumatica is associated with both HLA-DRB1*0401 and DRB1*0404" BRITISH JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, vol. 35, 1996, pages 632-635, XP000878853 le document en entier</p>	1-4, 6, 11, 14, 18
Y	<p>TAKEUCHI F ET AL.: "Positive and negative association of HLA-DR genotypes with Japanese theumatoid arthritis" CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY, vol. 14, 1996, pages 17-22, XP000878869 le document en entier</p>	1-4, 6, 11, 17, 18
Y	<p>NEPOM G T ET AL.: "HLA genes associated with rheumatoid arthritis" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, vol. 32, no. 1, 1989, pages 15-21, XP000879219 cité dans la demande le document en entier</p>	1-4, 6-8, 11
Y	<p>WAGNER U ET AL.: "HLA markers and prediction of clinical course and outcome in rheumatoid arthritis" ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 40, no. 2, 1997, pages 341-351, XP000878856 le document en entier</p>	1-4, 11, 18, 19
Y	<p>GAO X ET AL.: "DNA typing for class II HLA antigens with allele-specific or group-specific amplification" HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 30, 1991, pages 147-154, XP000889911 le document en entier</p>	1, 4, 7, 8
A	<p>WO 97 20070 A (ANTHONY NOLAN BONE MARROW TRUS ; ARGUELLO RAFAEL (GB); MADRIGAL ALE) 5 juin 1997 (1997-06-05) * see especially page 35, line 14 * le document en entier</p>	
	-/-	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der > Internationale No

PCT/FR 00/01385

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>CEREB N ET AL: "LOCUS-SPECIFIC AMPLIFICATION OF HLA CLASS I GENES FROM GENOMIC DNA: LOCUS-SPECIFIC SEQUENCES IN THE FIRST AND THIRD INTRONS OF HLA-A, -B, AND -C ALLELES"</p> <p>TISSUE ANTIGENS,DK,MUNKSGAARD, COPENHAGEN, vol. 45, 1995, pages 1-11, XP000197333</p> <p>ISSN: 0001-2815</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 92 08117 A (APPLIED BIOSYSTEMS)</p> <p>14 mai 1992 (1992-05-14)</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	
A	<p>ANGELINI G ET AL.: "High-resolution analysis of the human HLA-DR polymorphism by hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA,</p> <p>vol. 83, 1986, pages 4489-4493,</p> <p>XP002133034</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 99 19509 A (LEUSHNER JAMES ;GAREY CAROLINE ELIZABETH (CA); VISIBLE GENETICS IN) 22 avril 1999 (1999-04-22)</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	
A	<p>EP 0 887 423 A (BIOTEST AG)</p> <p>30 décembre 1998 (1998-12-30)</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	
A	<p>WORDSWORTH B P ET AL: "HLA-DR TYPING USING DNA AMPLIFICATION BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION AND SEQUENTIAL HYBRIDIZATION TO SEQUENCE-SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE PROBES"</p> <p>IMMUNOGENETICS,DE,SPRINGER VERLAG, BERLIN, vol. 32, 1 janvier 1990 (1990-01-01), pages 413-418, XP002911048</p> <p>ISSN: 0093-7711</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 99 07883 A (LEUSHNER JAMES ;VISIBLE GENETICS INC (CA); BLASCZYK RAINER H (DE)) 18 février 1999 (1999-02-18)</p> <p>* see especially clam 14 (Sequence NO:436)</p> <p>*</p> <p>le document en entier</p> <p>-----</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den > Internationale No

PCT/FR 00/01385

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2679252 A	22-01-1993	AT 174064 T	15-12-1998
		AU 659866 B	01-06-1995
		AU 2388592 A	23-02-1993
		CA 2091775 A	18-01-1993
		DE 69227756 D	14-01-1999
		DE 69227756 T	29-07-1999
		EP 0549776 A	07-07-1993
		ES 2126597 T	01-04-1999
		WO 9302213 A	04-02-1993
		JP 6501622 T	24-02-1994
		US 5976789 A	02-11-1999
WO 9835059 A	13-08-1998	AU 6321998 A	26-08-1998
		EP 0986650 A	22-03-2000
US 5468611 A	21-11-1995	US 5545526 A	13-08-1996
		US 5702885 A	30-12-1997
WO 9746700 A	11-12-1997	FR 2749308 A	05-12-1997
		EP 0910667 A	28-04-1999
JP 8308596 A	26-11-1996	US 5939542 A	17-08-1999
US 5567809 A	22-10-1996	AT 164630 T	15-04-1998
		AU 656161 B	27-01-1995
		AU 9136191 A	08-07-1992
		CA 2075037 A	07-06-1992
		DE 69129192 D	07-05-1998
		DE 69129192 T	22-10-1998
		DK 514534 T	11-01-1999
		EP 0514534 A	25-11-1992
		ES 2115667 T	01-07-1998
		JP 6505625 T	30-06-1994
		WO 9210589 A	25-06-1992
		AT 73502 T	15-03-1992
		AT 125307 T	15-08-1995
		AU 594130 B	01-03-1990
		AU 6996287 A	17-09-1987
		CA 1284931 A	18-06-1991
		DE 3751423 D	24-08-1995
		DE 3777213 D	16-04-1992
		EP 0237362 A	16-09-1987
		EP 0459532 A	04-12-1991
		EP 0459533 A	04-12-1991
		HK 145894 A	30-12-1994
		JP 2703194 B	26-01-1998
		JP 7313197 A	05-12-1995
		JP 2726659 B	11-03-1998
		JP 62214355 A	21-09-1987
		JP 3070837 B	31-07-2000
		JP 10155500 A	16-06-1998
		SG 132994 G	13-01-1995
		US 5541065 A	30-07-1996
		US 5310893 A	10-05-1994
		US 5665548 A	09-09-1997
		US 5468613 A	21-11-1995
		US 6040166 A	21-03-2000
		US 5604099 A	18-02-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der
s Internationale No
PCT/FR 00/01385

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP 6090757 A	05-04-1994	AUCUN	
WO 9720070 A	05-06-1997	AU 7703896 A EP 0876508 A	19-06-1997 11-11-1998
WO 9208117 A	14-05-1992	NL 9002259 A AT 186945 T DE 69131801 D DE 69131801 T EP 0553247 A US 5759771 A	18-05-1992 15-12-1999 30-12-1999 18-05-2000 04-08-1993 02-06-1998
WO 9919509 A	22-04-1999	US 5910413 A AU 9425798 A EP 1021559 A	08-06-1999 03-05-1999 26-07-2000
EP 0887423 A	30-12-1998	EP 0892069 A	20-01-1999
WO 9907883 A	18-02-1999	AU 8846898 A EP 1003917 A	01-03-1999 31-05-2000

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.